

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program:

Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:

Molekulární biologie a biochemie organismů



Karolína Pokorná

Vliv fosforylace na jaderný import virových proteinů a komplexů

Role of phosphorylation in nuclear import of viral proteins and complexes

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 7. 5. 2015

Podpis

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za cenné připomínky a rady při vypracování této bakalářské práce. Poděkovat bych chtěla také svým rodičům za podporu při studiu.

Abstrakt

Replikace celé řady virů probíhá v jádře hostitelské buňky. Tyto viry objevily způsob jak překonat překážku v podobě jaderného obalu a často doslova přimět buňku, aby zajistila jaderný import jejich proteinů a genomu. Pro mnoho virových proteinů je důležité, aby byl jejich transport do jádra přesně načasován. Díky tomu je zajištěn ideální průběh replikace viru, případně je umožněno, aby protein během životního cyklu viru plnil různé funkce v závislosti na své lokalizaci. Jedním ze způsobů regulace jaderného importu virových proteinů je jejich fosforylace. Fosforylace může jaderný import virových proteinů a komplexů kontrolovat různými způsoby. Například může ovlivnit afinitu virového proteinu k importinům nebo jiným buněčným proteinům, nebo také vyvolat změnu konformace proteinu, která vede k vystavení lokalizační sekvence.

Klíčová slova: fosforylace, virus, jaderný import, virové proteiny, vstup do jádra

Abstract

Replication of many different viruses occurs in the nucleus of the host cell. These viruses discovered ways how to overcome the nuclear membrane and often use cell transport machinery to transport their proteins and genome into the nucleus. For many viral proteins the timing of their nuclear import in order to secure correct viral replication is important. Regulated nuclear import also allows these proteins to perform several functions depending on their localization. Nuclear import of viral proteins and complexes can be regulated by phosphorylation. Phosphorylation can, for example, modulate affinity of proteins for importins or other cellular proteins. Phosphorylation can also cause conformational change, which can lead to unmasking of localization sequence.

Key words: phosphorylation, virus, nuclear import, viral protein, nuclear entry

Seznam použitých zkratek

AVS 17	avian sarcoma virus 17	AVS 17; resp. virus ptačího sarkomu 17
BM1	influenza B matrix protein	matrixový protein viru influenza B
BRAP2	BRCA1-associated protein 2	protein 2 vázající protein BRCA1
cccDNA	covalently closed circular DNA	kovalentně uzavřená kruhová DNA
CDK1	cyclin-dependent kinase 1	cyklin dependentní kináza 1
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	cyklin dependentní kináza 2
CK1	casein kinase 1	kaseinová kináza 1
CK2	casein kinase 2	kaseinová kináza 2
CRM1	chromosome region maintenance protein 1	protein údržby chromozomálního regionu 1
dsDNA	double-stranded DNA	dvouvláknová DNA
dsDNA-PK	ds DNA-dependent protein kinase	kináza dependentní na dsDNA
EBNA-1	Epstein-Barr nuclear antigen 1	jaderný antigen 1 EBV
EBV	Epstein-Barr virus	virus Epstein-Barrové
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	specifická enzymová reakce prokazující přítomnost protilátek
ERK1	extracellular-signal-regulated kinase 1	kináza regulovaná extracelulárním signálem 1
ERK2	extracellular-signal-regulated kinase 2	kináza regulovaná extracelulárním signálem 2
G1 (fáze)	growth phase 1	fáze růstu 1
G2 (fáze)	growth phase 2	fáze růstu 2
GAPD-PK	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase	proteinkináza glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
GTP	guanosine triphosphate	guanosintrifosfát
HBc	core protein	protein core (kapsidy) HBV
HBV	hepatitis B virus	virus hepatitidy B
HCMV	human cytomegalovirus	lidský cytomegalovirus
HIV	human immunodeficiency virus	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPV11	human papillomavirus type 11	lidský papilomavirus typu 11

HTLV-1	human T-cell leukemia virus type 1	HTLV-1; resp. virus lidské T-buněčné leukémie typu 1
HTLV-2	human T-cell leukemia virus type 2	HTLV-2; resp. virus lidské T-buněčné leukémie typu 2
JAK	Janus kinase	Janusova kináza
JNK1	c-Jun N-terminal kinase 1	kináza N konce c-Jun 1
M1	matrix protein	matrixový protein
MA	matrix protein	matrixový protein
MAP	mitogen-activated protein kinases	mitogenem aktivované
(kinázy)		proteinkinázy
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
NES	nuclear export signal	jaderný exportní signál
NLS	nuclear localization signal	jaderný lokalizační signál
NP	nucleoprotein	nukleoprotein
NPC	nuclear pore complex	jaderný pór
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
PKA	protein kinase A	proteinkináza A
PKC	protein kinase C	proteinkináza C
pgRNA	pregenomic RNA	pregenomová RNA
pRb	retinoblastoma protein	retinoblastomový protein
RAN	RAS-related nuclear protein	jaderný protein příbuzný s proteiny Ras
RVPK	rabies virus protein kinase	proteinkináza viru vztekliny
S (fáze)	synthesis phase	syntetická fáze
SIV	simian immunodeficiency virus	SIV; resp. virus opičí imunitní nedostatečnosti
SRPK	serine-arginine protein kinase	serin-argininová proteinkináza
SRPK 2	serine-arginine protein kinase 2	serin-argininová proteinkináza 2
ssRNA	single-stranded RNA	jednovláknová RNA
SV40	simian virus 40	SV40; resp. opičí virus 40
T-ag	large T antigen	velký T antigen
VZV	varicella zoster virus	virus varicella zoster

Obsah

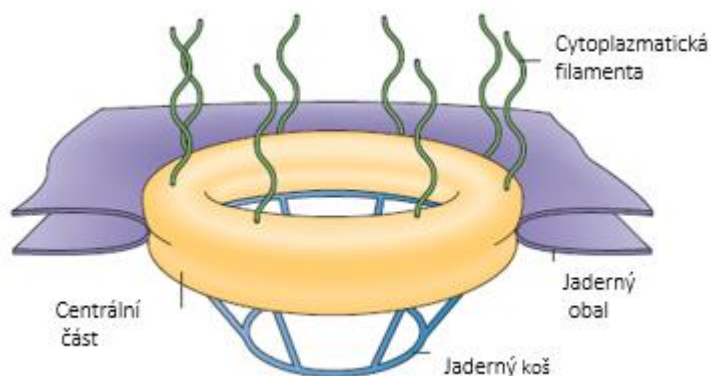
1. Úvod	1
2. Vliv fosforylace na jaderný import velkého T antigenu viru SV40	2
2.1 Virus SV40	2
2.2 Fosforylace T-antigenu zvyšuje jeho afinitu k importinům	2
2.3 Fosforylace může vést k vazbě T-antigenu k cytoplazmatickým proteinům	3
3. Vliv fosforylace na jaderný import proteinů virů patřících do čeledi <i>Herpesviridae</i>	5
3.1 Lidský cytomegalovirus	5
3.1.1 Jaderný import proteinu ppUL44 může být aktivován i inhibován fosforylací proteinu.	5
3.1.2 Jaderný import proteinu pp71 závisí na jeho fosforylaci.....	7
3.2 Virus Epstein-Barrové	8
3.2.1 Fosforylace proteinu EBNA-1 zesiluje jeho vazbu k importinu α 5.....	8
3.3 Virus varicella zoster	9
3.3.1 Fosforylace proteinu IE62 reguluje jeho buněčnou lokalizaci a funkci	9
4. Vliv fosforylace na jaderný import proteinů virů patřících do čeledi <i>Papillomaviridae</i>	11
4.1 Fosforylace ovlivňuje lokalizaci proteinu E1 lidského papilomaviru typu 11	11
4.1.1 Fosforylace umožňuje jaderný import proteinu E1	11
4.1.2 Fosforylace určuje, zda si E1 udrží jadernou lokalizaci	12
4.2 Fosforylace proteinu E1 bovinního papilomaviru ovlivňuje jeho jadernou lokalizaci.....	12
4.2.1 Fosforylace inhibuje vazbu E1 a importinů.....	13
4.2.2 Fosforylace vede k jadernému exportu E1	13
5. Vliv fosforylace na jaderný import viru hepatitidy B	13
5.1 Virus hepatitidy B.....	13
5.2 Vliv fosforylace kapsidového proteinu na jaderný import HBV	15
6. Vliv fosforylace na jaderný import proteinů viru influenza A	18
6.1 Virus influenza A.....	18
6.2 Jaderný import virového genomu je možná regulován fosforylací nukleoproteinu	18
6.3 Jaderný import matrixového proteinu závisí na jeho fosforylaci	20
6.4 Vliv fosforylace na lokalizaci matrixového proteinu viru influenza B	20
7. Vliv fosforylace na jaderný import proteinu P viru vztekliny.....	21
8. Vliv fosforylace na jaderný import proteinů virů patřících do čeledi <i>Retroviridae</i>	23
8.1 Fosforylace umožňuje jaderný import proteinu Rex-2 viru HTLV-2	23
8.2 Vliv fosforylace na jaderný import preintegračního komplexu viru HIV	24
8.3 Fosforylace kontroluje jaderný import preintegračního komplexu viru SIV	25
8.4 Fosforylace inhibuje jaderný import proteinu v-Jun viru AVS 17	26

9. Závěr.....	27
Seznam použité literatury	28

1. Úvod

Viry jsou obligátní vnitrobuněční parazité, které spojuje to, že ke své replikaci využívají translační aparát buňky a často i další buněčné enzymy. Mnoho virů se replikuje v jádře hostitelské buňky. Replikace v jádře jim poskytuje celou řadu výhod – viry zde mohou využít hostitelské DNA i RNA polymerázy nebo třeba sestříhový aparát. Tím se snižuje množství faktorů nezbytných pro replikaci, které by musely samy kódovat. Na druhou stranu ale replikace v jádře přináší novou překážku, kterou musí viry překonat, přičemž v tomto případě lze mluvit o překážce doslovně – musí dojít k transportu virového genomu a proteinů do jádra přes jadernou membránu.

Jádro je od zbytku buňky odděleno jaderným obalem, tvořeným vnější a vnitřní jadernou membránou. Transport do jádra je možný přes proteinové komplexy – jaderné póry (NPC), (Obrázek 1). Jaderný import může probíhat dvěma způsoby. Molekuly menší než 40 kDa mohou do jádra vstoupit pasivní difúzí. Větší proteiny a komplexy ale musí využít specializované proteiny importiny, které se na ně vážou a zprostředkují jejich jaderný import. Importiny rozpoznávají proteinovou sekvenci, která určuje, že protein má být transportován do jádra – jaderný lokalizační signál (NLS). Tyto signály se nejčastěji skládají z jedné nebo dvou částí a je pro ně charakteristické, že obsahují hodně bazických aminokyselin. Tento transportní systém vyžaduje energii, která je získávána hydrolýzou GTP pomocí malých GTPáz RAN. (Přehledně zpracováno v (Mosammaparast & Pemberton, 2004)). Obdobně transport z jádra do cytoplazmy zajišťují exportiny rozpoznávající jaderný exportní signál (NES).



Obrázek 1: **Struktura jaderného póru**

Na obrázku je znázorněna struktura jaderného póru propojujícího cytoplazmu a jádro.

Převzato a upraveno podle přehledného článku (Stewart, 2007).

Mnoho virů objevilo způsob, jak jaderný obal překonat a často doslova přimět buňku, aby zajistila jaderný import jejich proteinů, například vystavením NLS na povrchu proteinu. Jejich jaderný import může (a často musí) být regulován. Jedním ze způsobů regulace je fosforylace – posttranslační modifikace, během které dochází k reverzibilnímu připojení fosfátové skupiny k proteinu.

Cílem této práce je na příkladech jednotlivých virů ukázat, jakým způsobem fosforylace virových proteinů a komplexů ovlivňuje jejich transport do jádra hostitelské buňky.

2. Vliv fosforylace na jaderný import velkého T antigenu viru SV40

2.1 Virus SV40

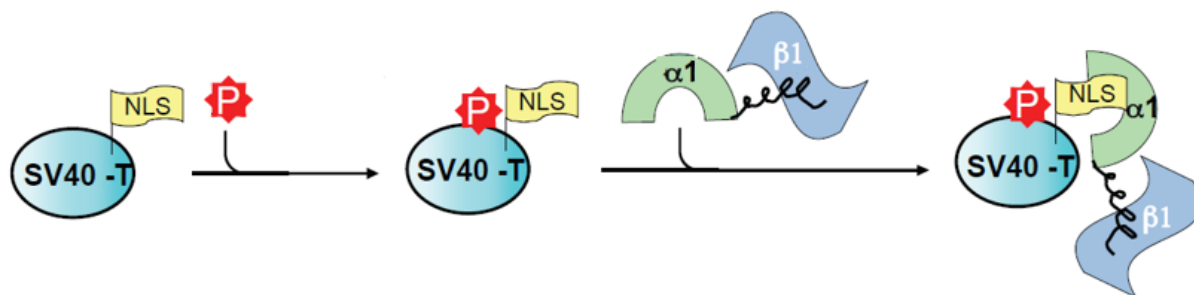
Virus SV40 (simian virus 40) se řadí do čeledi *Polyomaviridae*. Jde o malý neobalený virus s kapsidou s ikosahedrální symetrií. Jeho genom je tvořen kruhovou dsDNA. Virus se replikuje v jádře infikovaných buněk a způsobuje persistentní infekci. SV40 je virus infikující opice, ale nálezy virové sekvence v lidských nádorech rozproudily diskuzi, zda může být SV40 příčinou rakoviny u lidí. Zatím ovšem chybí uspokojivé důkazy, které by tuto domněnku podpořily. (Přehledně zpracováno v (Butel & Lednický, 1999)).

Pro tuto práci je zajímavý jaderný import velkého T antigenu (T-ag), virového proteinu naprosto zásadního pro úspěšnou replikaci SV40. T-ag plní celou řadu funkcí. Je to jediný virový protein nezbytný pro replikaci virového genomu (Waga *et al.*, 1994), slouží jako iniciátor replikace (Tegtmeyer, 1972) i jako DNA helikáza (Stahl *et al.*, 1986). Podílí se také na regulaci transkripce (May *et al.*, 1992; Reed *et al.*, 1976), či transformaci hostitelské buňky (Eckner *et al.*, 1996; Resnick-Silverman *et al.*, 1991). Bylo zjištěno, že některé z těchto funkcí mohou být ovlivněny fosforylací T-ag (Scheidtmann *et al.*, 1984; Schneider & Fanning, 1988). Jeden ze způsobů, jakým může fosforylace ovlivňovat funkce proteinu, je regulace jeho transportu do jádra hostitelské buňky.

2.2 Fosforylace T-antigenu zvyšuje jeho afinitu k importinům

T-ag viru SV40 obsahuje jaderný lokalizační signál, který se nachází mezi aminokyselinami 126 – 132 (Rihs & Peters, 1989). K němu přiléhá sekvence aminokyselin 111 – 125, (dále uváděná jako doprovodná sekvence NLS), s několika fosforylačními místy (Scheidtmann *et al.*, 1982). Sekvence NLS T-ag je sama o sobě postačující pro zajištění jaderného importu proteinu. Nicméně experimenty, které sledovaly buněčnou lokalizaci různě mutovaných peptidů obsahujících NLS a doprovodnou sekvenci NLS, ukázaly, že přítomnost doprovodné sekvence NLS významně ovlivňuje kinetiku jaderného importu. Její přítomnost zesiluje účinnost NLS T-ag (Rihs & Peters, 1989; Vancurova *et al.*, 1995). Protože tato sekvence neobsahuje bazické aminokyseliny, jejichž přítomnost je typická pro jaderné lokalizační signály, ani se nepodobá dříve popsáním NLS, Rihs a Peters (1989) usoudili, že tento vliv na jaderný import nemůže být připsán přítomnosti dalšího NLS, který by se nacházel v doprovodné sekvenci. Namísto toho navrhli, že by jaderný import mohl být ovlivněn fosforylací aminokyselin doprovodné sekvence.

Záhy se podařilo prokázat, že tato myšlenka byla správná. Pomocí substitučních mutací, kdy byla fosforylační místa doprovodné sekvence NLS nahrazována aminokyselinami, které nemohou být fosforylovány, bylo ukázáno, že fosforylace serinu 111 nebo serinu 112 pomocí



Obrázek 2: **Fosforylace serinu 111 nebo serinu 112 zvyšuje účinnost jaderného importu SV40**

Fosforylace serinu 111 nebo 112 pomocí CK2 zvyšuje afinitu T-ag k importinu. Samotné fosforylované aminokyseliny se ale nepodílí na vazbě.

Převzato a upraveno podle přehledného článku (Nardozzi *et al.*, 2010b).

kinázy CK2 má pozitivní vliv na jaderný import (Rihs *et al.*, 1991), stejně jako fosforylace serinu na pozici 120 kinázou dsDNA-PK. Navíc bylo ukázáno, že fosforylace serinu 120 kinázou dsDNA-PK zvyšuje pravděpodobnost, že dojde k fosforylaci fosforylačního místa pro CK2. Tato skutečnost naznačuje možné funkční propojení těchto fosforylačních míst (Xiao *et al.*, 1997).

Hübner *et al.* (1997) navrhli, že příčina toho, že fosforylace těchto aminokyselinových zbytků ovlivňuje jaderný import proteinu, může spočívat v tom, že fosforylace má vliv na afinitu jaderného lokalizačního signálu a jeho receptoru. Aby tuto myšlenku ověřili, vyvinuli metodu, založenou na podobném principu jaký využívá metoda ELISA, umožňující zjišťovat a kvantifikovat vazbu fúzních proteinů na importiny. Ukázali, že samotná přítomnost doprovodné sekvence, zvyšuje až desetinásobně šanci, že bude NLS rozpoznán komplexem importinu α a β . Navíc fosforylace serinu 111 nebo 112 pomocí CK2 zvyšuje pravděpodobnost navázání importinu o dalších 40 %. V pozdější práci bylo ukázáno, že vazbu k importinům zvyšuje také fosforylace serinu 120. Její autoři na základě těchto dat navrhli, že fosforylační místa doprovodné sekvence NLS pro CK2 a dsDNA-PK by mohla přímo interagovat s importinem α (Xiao *et al.*, 1997). Analýza struktury vazby importinu α a T-ag ovšem odhalila, že přestože doprovodná sekvence NLS se přímo podílí na vazbě na receptor, fosforylační místo pro CK2 s importinem α nijak neinteraguje (Obrázek 2). Nicméně Serin 120 s importinem interagovat může (Fontes *et al.*, 2003), a tak je možné, že fosforylace této aminokyseliny přímo zesiluje vazbu k importinu.

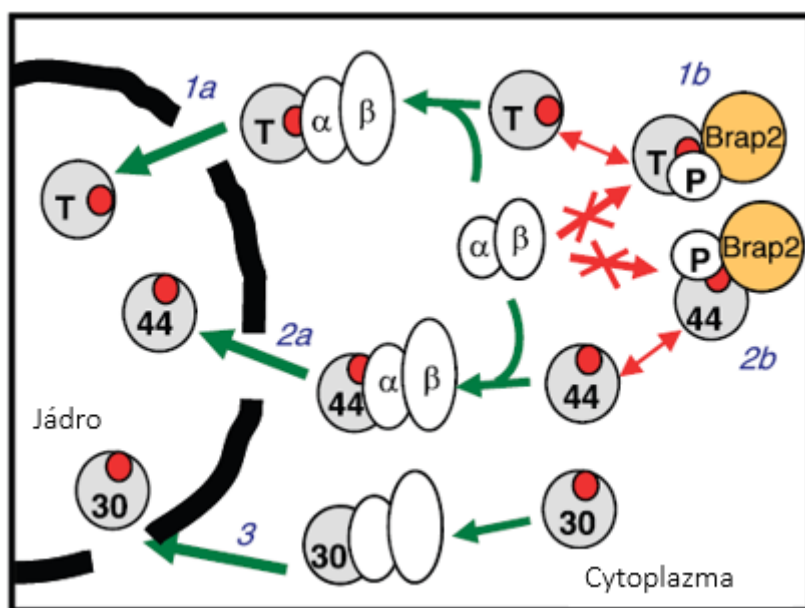
2. 3 Fosforylace může vést k vazbě T-antigenu k cytoplazmatickým proteinům

Na druhou stranu, jak ukázala práce zabývající se buněčnou lokalizací fúzních proteinů fosforylovaných *in vitro* pomocí kinázy CDK2, fosforylace threoninu 124 má na jaderný import T-ag opačný efekt, než fosforylace dosud zmíněných aminokyselin – vede k jeho inhibici (Jans *et al.*, 1991). Nepodařilo se ovšem prokázat, že by měla vliv na rozpoznávání NLS receptorem (Hübner *et al.*, 1997).

Možné vysvětlení vlivu této fosforylace navrhli Jans a kolektiv (1991), kteří vyslovili domněnku, že může způsobit cytoplazmatickou lokalizaci T-ag například zvýšením afinity proteinu k některému cytoplazmatickému proteinu. Pozdější práce prokázala, že tuto roli jakési „kotvy“ může plnit cytoplazmatický protein BRAP2. Její autoři pozorovali, že nadměrná exprese BRAP2 v buňkách vedla k významnému snížení míry jaderného importu T-ag. Pomocí imunoprecipitace a metody „AlphaScreen“ zjistili, že T-ag přímo interaguje s C koncovou doménou proteinu BRAP2, a že tato vazba je závislá na negativním náboji aminokyseliny na pozici 124. Pokud je threonin 124 fosforylován, dochází k vazbě T-ag na BRAP2 a nedojde k jeho translokaci do jádra.

Autoři této práce dále ukázali, že stejným způsobem BRAP2 inhibuje jaderný import proteinu ppUL44 lidského cytomegaloviru (HCMV). U ppUL44 je tato blokáda jaderného importu závislá na fosforylačním místě v rámci NLS (Fulcher *et al.*, 2010a), (Obrázek 3).

Vědci z téže skupiny také popsali, že jaderný import T-ag může být inhibován vazbou proteinu pRb na vazebné místo, které se nachází mezi aminokyselinami 102 – 110. Jaderný import je zablokován pravděpodobně proto, že komplex těchto dvou proteinů není rozpoznáván importiny. Fosforylace serinu 106 zvyšuje šanci, že dojde k vazbě pRb a zesiluje tak tuto inhibici (Fulcher *et al.*, 2010b).



Obrázek 3: **Zadržení virových proteinů v cytoplasmě vazbou na BRAP2**

1a: Komplex importinů interaguje s NLS T-ag SV40 a zprostředkovává jeho jaderný import.

1b: Pokud je threonin 124 fosforylován, může dojít k vazbě T-ag k cytoplazmatickému proteinu BRAP2. Poté nedochází k jadernému importu T-ag.

2a: Komplex importinů interaguje s NLS ppUL44 HCMV a zprostředkovává jeho jaderný import.

2b: Fosforylace threoninu 427 vede k cytoplazmatické lokalizaci ppUL44 způsobené vazbou proteinu na BRAP2.

3: Nepodařilo se prokázat, že by BRAP2 tímto způsobem reguloval jaderný import některého proteinu, který nemá fosforylační místo v rámci NLS. Obrázek tuto skutečnost znázorňuje na příkladu proteinu pUL30 HCMV, který je importován do jádra pomocí interakce svého NLS s komplexem importinů, ovšem neváže BRAP2.

Převzato a upraveno podle (Fulcher *et al.*, 2010a).

3. Vliv fosforylace na jaderný import proteinů virů patřících do čeledi *Herpesviridae*

Čeď *Herpesviridae* v sobě zahrnuje řadu virů, které spojují některé základní charakteristiky. Viry mají kapsidu s ikosahedrál ní symetrií a jsou obalené. Mezi kapsidou a obalem se nachází proteinová vrstva nazývaná tegument. Jejich genom, který je replikován v jádře hostitelské buňky, je tvořen lineární dsDNA, která je po vstupu do jádra cirkularizována. Tyto viry se dále vyznačují tím, že způsobují nejen lytickou infekci, ale také mohou setr vát v buňce v latentním stavu ve formě episomu. (Přehledně zpracováno v (Knipe & Howley, 2007)).

3.1 Lidský cytomegalovirus

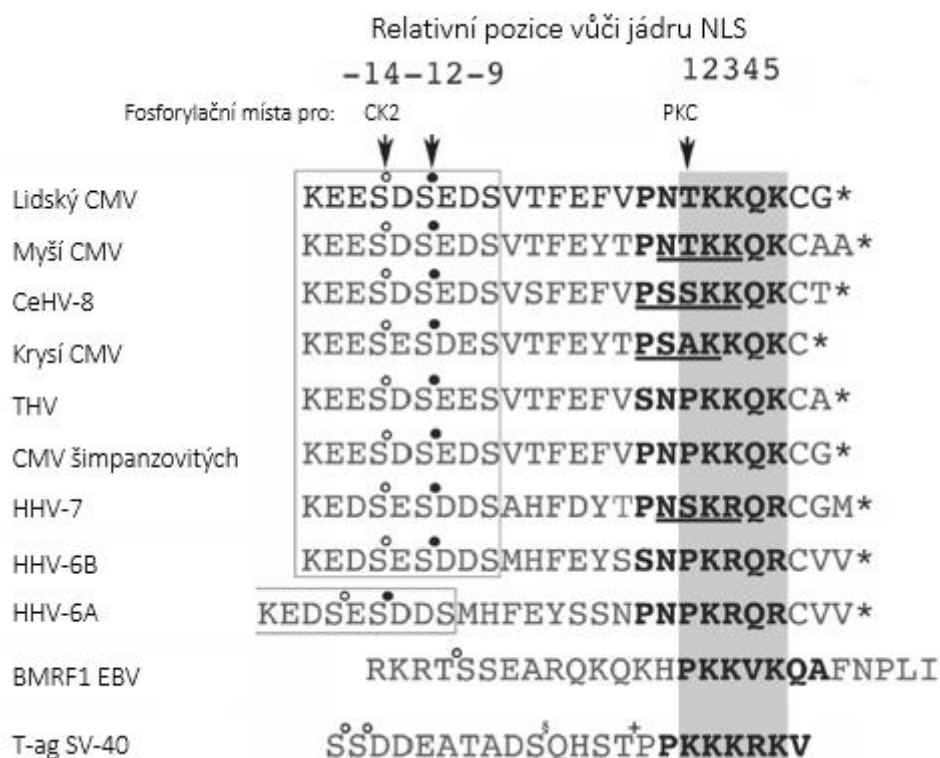
Lidský cytomegalovirus je patogen s celosvětově vysokou prevalencí. Přestože u zdravých jedinců je infekce zpravidla bezpříznaková, virus může způsobit závažná onemocnění u imunodeficientních pacientů, jako jsou HIV pozitivní lidé nebo pacienti po transplantacích. Další riziko představuje prenatální přenos z matky na dítě způsobující kongenitální malformace novorozenců. (Přehledně zpracováno v (Boeckh & Geballe, 2011)).

3.1.1 Jaderný import proteinu ppUL44 může být aktivován i inhibován fosforylací proteinu

PpUL44 je protein, který je zásadní pro úspěšnou virovou replikaci (Alvisi *et al.*, 2009; Pari *et al.*, 1993; Ripalti *et al.*, 1995), interaguje s virovou polymerázou a ovlivňuje její procesivitu (Appleton *et al.*, 2006; Ertl & Powell, 1992; Loregian *et al.*, 2004). Bylo ukázáno, že ppUL44 může být posttranslačně modifikován - může být fosforylován pomocí virové kinázy UL97 (Krosky *et al.*, 2003; Marschall *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2011), či buněčných kináz CDK1 (Silva *et al.*, 2011), CK2 a CK1 (Alvisi *et al.*, 2011).

PpUL44 obsahuje mezi aminokyselinami 425 – 431 jaderný lokalizační signál, který umožňuje interakci s komplexem importinů α a β a transport proteinu do jádra. Pomocí metody „alignment“ bylo ukázáno, že sekvence NLS je vysoce konzervovaná mezi homology ppUL44. To platí i pro sekvenci přiléhající k NLS, která obsahuje několik fosforylačních míst pro CK2. Vysoká podoba této sekvence mezi proteiny naznačuje, že by mohla být důležitá pro funkci proteinu. Navíc skutečnost, že se v blízkosti NLS ppUL44 nachází fosforylační místo pro CK2, připomíná strukturu NLS proteinu T-ag SV40, kde toto uspořádání hraje roli v jaderném importu (Alvisi *et al.*, 2005), (Obrázek 4).

Kvůli této podobě se Alvisi a kolektiv (2005) rozhodli otestovat, zda sekvence přiléhající k NLS může obdobně ovlivňovat jaderný import ppUL44. Provedli proto sérii experimentů



Obrázek 4: Sekvence NLS ppUL44 HCMV a přiléhající oblasti je mezi homology ppUL44 vysoce konzervovaná

Tučně jsou zvýrazněny sekvence předpokládaných NLS homologů ppUL44. Potenciální fosforylační místa pro PKC jsou podtržena. Kolečka označují potenciální fosforylační místa pro CK2, (černě vybarvená kolečka označují místa fosforylovatelná až po fosforylaci prvního serinu tzv. kaskádovou fosforylací).

Vysoká konzervovanost této sekvencí naznačuje, že by mohla hrát významnou roli pro funkci proteinu. Sekvence také připomíná motiv popsáný u T-ag viru SV40.

Převzato a upraveno podle (Alvisi *et al.*, 2005).

analogických k těm, které prokázaly tento vliv u T-ag. Jejich práce ukázala, že přítomnost této sekvence zvyšuje míru jaderného importu proteinu, a že tento vliv je umocněn fosforylací serinu 413. Rovněž prokázali, že tento efekt je způsoben zvýšením afinity NLS k importinu.

Dále bylo zjištěno, že fosforylace serinu 413 spouští kaskádovou fosforylací serinů 415 a 418 (Alvisi *et al.*, 2011). Tyto tři seriny patří mezi nejčastěji fosforylované aminokyseliny proteinu a o významu této posttranslační modifikace vypovídá, že substituce těchto serinů za alaninyablokovala jaderný import proteinu a s ním i replikaci viru (Alvisi *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011).

Opačný vliv má fosforylace threoninu 427 proteinkinázou C (PKC), která vede k drastickému snížení jaderného importu proteinu (Alvisi *et al.*, 2011). Fosforylační místo na pozici 427 můžeme opět přirovnat k T-ag viru SV40. U obou proteinů je jaderný import inhibován fosforylací threoninu, který se nachází v NLS či jeho těsné blízkosti, (u T-ag jej představuje threonin 124). Navíc, jak již bylo uvedeno v kapitole 2.3, zde vzájemná podobnost nekončí. Bylo ukázáno, že fosforylace obou těchto aminokyselinových zbytků může inhibovat jaderný import

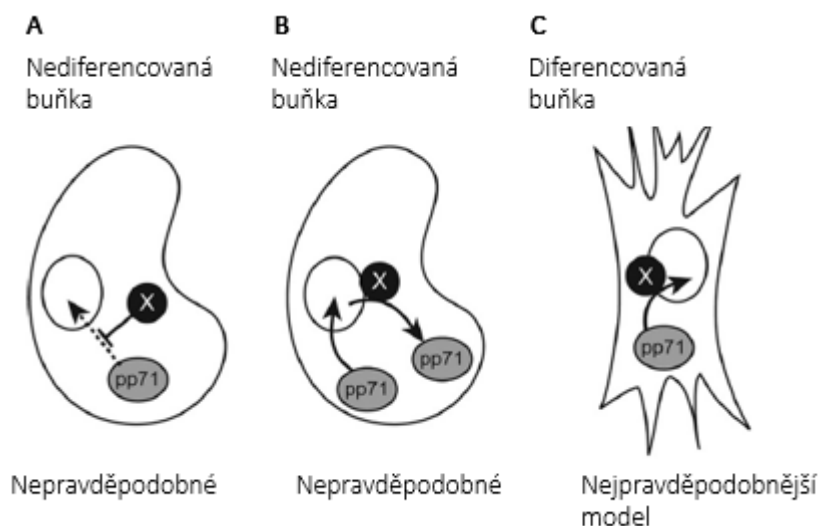
proteinu stejným způsobem – v obou případech vede k interakci proteinu s cytoplazmatickým proteinem BRAP2 (Fulcher *et al.*, 2010a), (Obrázek 3).

3.1.2 Jaderný import proteinu pp71 závisí na jeho fosforylaci

PpUL44 není jediný protein HCMV, jehož lokalizace v buňce závisí na fosforylaci. Dalším takovým proteinem je pp71, (v literatuře je používáno i označení ppUL82 podle genu, který jej kóduje). Pp71 je protein tegumentu, který se podílí například na iniciaci exprese virového genomu (Bresnahan & Shenk, 2000; Chau *et al.*, 1999; Liu & Stinski, 1992) nebo na modifikaci průběhu buněčného cyklu hostitelské buňky (Kalejta & Shenk, 2003a, b; Kalejta *et al.*, 2003).

Bylo popsáno, že pp71 je transportován do jádra (Hensel *et al.*, 1996), nicméně dlouho nebylo známo, jak translokace proteinu probíhá a ani dnes není tento proces plně objasněn. Analýza sekvence pp71 sice odhalila na C konci proteinu oblast připomínající dříve popsané NLS, nicméně bylo prokázáno, že tato doména nehraje v jaderném importu pp71 roli. Místo toho bylo pozorováno, že je pro translokaci důležitá oblast ze středu proteinové sekvence mezi aminokyselinami 215 – 284, a že oblasti k ní přiléhající jsou pravděpodobně důležité pro její rozpoznání (Shen *et al.*, 2008). Tato sekvence se ovšem nepochybně neliší od známých NLS. Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že threonin 223 může být fosforylován. Nabídla se tedy myšlenka, že by posttranslační úprava tohoto threoninu mohla mít na jaderný import pp71 vliv. Sledování buněčné lokalizace proteinu po substituci threoninu 223 za nefosforylovatelnou, nebo fosfomimetickou aminokyselinu skutečně prokázalo, že fosforylace na pozici 223 inhibuje jaderný import pp71. Zatím nebyl objeven mechanismus, kterým k této inhibici dochází. Autoři těchto poznatků navrhuji dva modely: První možnost je, že fosforylace threoninu 223 může ovlivnit konformaci pp71 tak, že nedochází k rozpoznání sekvence důležité pro jaderný import. Druhé navrhované řešení říká, že fosforylace znemožňuje pp71 vázat některý buněčný protein, který je vyžadován pro jaderný import pp71 (Shen *et al.*, 2008). Další možností by bylo, že stejně jako u ppUL44, fosforylace naopak zvyšuje afinitu k některému buněčnému proteinu lokalizovanému v cytoplazmě.

S vyjasněním, který z těchto scénářů je pravděpodobnější, by mohla pomoci práce skupiny, která se zabývala souvislostí buněčné lokalizace pp71 a míry diferenciací buňky (Penkert & Kalejta, 2010). V nediferencovaných fibroblastech je ustanovena latentní infekce a pp71 je lokalizován v cytoplazmě. Oproti tomu v plně diferencovaných fibroblastech je pp71 transportován do jádra a dochází k lytické replikaci viru. Autoři zmiňované práce se snažili zjistit, jak je transport regulován – zda je například v nediferencovaných buňkách blokován jeho import do jádra nebo zdali dochází k jeho okamžitému exportu zpět do cytoplazmy. Jejich práce ukázala, že v plně diferencovaných buňkách je pravděpodobně exprimován faktor či faktory, které jsou nezbytné pro translokaci pp71 (Obrázek 5).



Obrázek 5: **Jaderný import pp71**
(A) Jako nepravděpodobný se jeví model navrhuující, že jaderný import proteinu je v nediferencovaných buňkách aktivně blokován
(B) nebo že je protein po transportu do jádra exportován zpět do cytoplazmy.
(C) Nejpravděpodobnější možnost je, že v diferencovaných buňkách dochází k expresi dosud neurčeného faktoru, který zajistí jaderný import pp71.
Převzato a upraveno podle (Penkert & Kalejta, 2010).

Tyto výsledky tedy naznačují, že jaderný import pp71 je zprostředkován interakcí s některým buněčným proteinem. K této interakci by tak mohlo docházet v oblasti, kterou charakterizovali jako zásadní pro jaderný import Shen a kolektiv (viz strana 7), což by vysvětlovalo, proč je tato sekvence odlišná od jiných popsanych sekvencí zajišťujících jaderný import. Schopnost vázat tento buněčný protein by pak byla negativně ovlivněna fosforylací threoninu 223.

3.2 Virus Epstein-Barrové

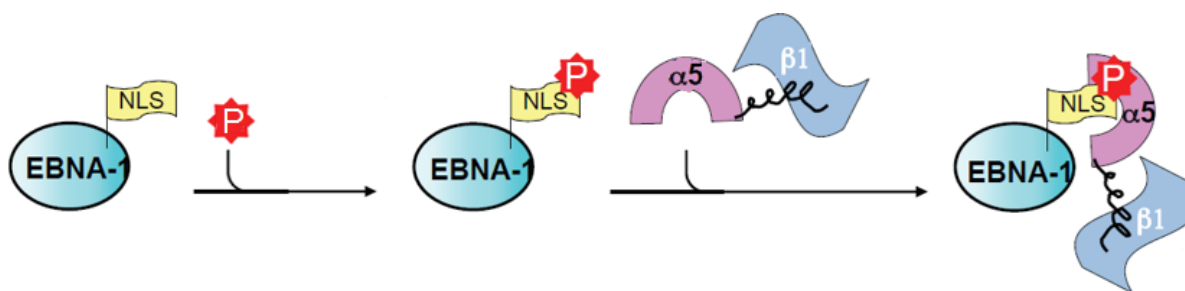
Virus Epstein-Barrové (EBV) je jedním s nejrozšířenějších lidských virů – infikováno je více než 90 % lidí. Zatímco nákaza v dětském věku je zpravidla bezpříznaková, lidé infikováni v pozdějším věku často onemocní infekční mononukleózou. EBV je také spojen se závažnými nádorovými onemocněními jako je Burkittův lymfom nebo Hodgkinova choroba. (Přehledně zpracováno v (Cohen, 2000)).

3.2.1 Fosforylace proteinu EBNA-1 zesiluje jeho vazbu k importinu $\alpha 5$

Pro tuto práci je zajímavý virový protein EBNA-1. Protein EBNA-1 je nezbytný pro latentní replikaci EBV, zajišťuje udržení episomu v dělících se buňkách, podílí se na aktivaci exprese některých genů nebo i brání apoptóze hostitelské buňky (Hung *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 2003; Reisman & Sugden, 1986; Wu *et al.*, 2002). Některé z funkcí EBNA-1 mohou být regulovány jeho fosforylací (Cao *et al.*, 2014a; Duellman *et al.*, 2009; Shire *et al.*, 2006). Protein EBNA-1 tedy může být fosforylován a několik potvrzených i domnělých fosforylačních míst se nachází přímo v NLS, který je mezi aminokyselinami 379 – 386 (Ambinder *et al.*, 1991), či v jeho blízkosti (Cao *et al.*, 2014a; Duellman *et al.*, 2009; Frappier & O'Donnell, 1991; Kang *et al.*, 2011; Polvino-Bodnar *et al.*, 1988; Shire *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2009).

Nad možnou rolí těchto fosforylačních míst se zamýšlí práce zabývající se jaderným importem EBNA-1. Její autoři si všimli, že protein EBNA-1 syntetizovaný v bakterii *Escherichia coli* váže importin s menší efektivitou, než EBNA-1 získaný z lidské buněčné linie, a proto navrhli, že jaderný import proteinu by mohl být regulován fosforylací (Ito *et al.*, 2000). Vědci z téže skupiny o několik let později skutečně získali data, která tuto domněnku podporují. Provedli sérii pokusů, během kterých sledovali lokalizaci různě mutovaných fúzních proteinů vpravených do buněk mikroinjekcí a ukázali, že zatímco fosforylace serinu na pozici 383 nebo 386 snižuje účinnost jaderného importu EBNA-1, fosforylace serinu 385 ji naopak zvyšuje (Kitamura *et al.*, 2006). Dále zjistili, že fosforylace serinu 385 zesiluje vazbu EBNA-1 k importinu $\alpha 5$ (Kitamura *et al.*, 2006; Nardozi *et al.*, 2010a). Kitamura a kolektiv (2006) také pozorovali, že tento vliv na afinitu k importinu je specifický pro přítomnost fosfátu na serinu 385 – stejného efektu nebylo možno dosáhnout například nahrazením serinu fosfomimetickou aminokyselinou (Obrázek 6).

Nepřímý důkaz o vlivu fosforylace poskytuje také zjištění, že roscovitin, inhibitor CDK1, -2, -5 a -7, snižuje míru jaderného importu EBNA-1 (Kang *et al.*, 2011).



Obrázek 6: **Fosforylace serinu 365 zvyšuje účinnost jaderného importu EBNA-1**

Fosforylace serinu 365 nacházejícího se v NLS EBNA-1 zesiluje vazbu EBNA-1 k importinu $\alpha 5$ a zvyšuje účinnost jaderného importu proteinu.

Převzato a upraveno podle přehledného článku (Nardozi *et al.*, 2010b).

3.3 Virus varicella zoster

Dalším herpetickým virem, u kterého je zjištěno, že jaderný import některého z jeho proteinů je regulován fosforylací, je virus varicella zoster (VZV). Primární infekce tímto lidským patogenem způsobuje plané neštovice. Průběh tohoto onemocnění je relativně mírný, ovšem pokud onemocní těhotná žena, vzniká riziko, že dojde k malformacím plodu. Virus ustanovuje latentní infekci v nervových buňkách a jeho reaktivace je spojována s pásovým oparem. (Přehledně zpracováno v (Gershon & Gershon, 2013).

3.3.1 Fosforylace proteinu IE62 reguluje jeho buněčnou lokalizaci a funkci

IE62 je protein tegumentu (Kinchington *et al.*, 1992), který slouží jako hlavní transkripční aktivátor VZV (Perera *et al.*, 1992). V buňkách je IE62 transportován do jádra díky přítomnosti

jaderné lokalizační sekvence mezi aminokyselinami 676 – 685. Tato sekvence je velmi podobná známým NLS, a proto se předpokládá, že IE62 k jadernému importu pravděpodobně využívá buněčné importiny (Kinchington & Turse, 1998). IE62 může být fosforylován buněčnou kinázou CDK1 (Leisenfelder *et al.*, 2008) nebo CK2. Kromě toho jej mohou fosforylovat virem kódované kinázy – kináza kódovaná otevřeným čtecím rámcem 47 (kináza ORF47) (Kenyon *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 1994) a kináza kódovaná otevřeným čtecím rámcem 66 (kináza ORF66) (Eisfeld *et al.*, 2006).

Nepodařilo se prokázat, že by fosforylace virovou kinázou ORF47 měla vliv na funkci proteinu, ale bylo ukázáno, že kináza ORF66 může interferovat se schopností IE62 aktivovat transkripci. Autoři těchto zjištění se rozhodli prověřit, zda tento efekt může být způsoben schopností kinázy ORF66 ovlivňovat jaderný import proteinu. Sledovali lokalizaci IE62 v transfekovaných buňkách, kde byl IE62 exprimován samostatně nebo současně s některou z virových kináz. Samotný IE62 se nacházel primárně v jádře, stejně jako IE62 exprimovaný spolu s kinázou ORF47. Ovšem v buňkách, kde byl IE62 exprimován současně s kinázou ORF66, byla pozorována převážně cytoplazmatická lokalizace proteinu. Analýza mutované kinázy ORF66 dále ukázala, že aby k této inhibici jaderného importu mohlo dojít, je nezbytné, aby byla funkční kinázová doména proteinu (Kinchington *et al.*, 2000). Tato informace napověděla, že vliv na jaderný import souvisí s fosforylací, nebylo ovšem zřejmé, zda kináza ORF66 aktivuje některý potřebný buněčný faktor nebo se na inhibici jaderného importu IE62 podílí přímo.

Tento problém o několik let později vyřešili vědci z téže skupiny, když ukázali, že kináza ORF66 může přímo fosforylovat IE62 na dvou různých místech – serinu 686 a serinu 722. Substituce těchto dvou aminokyselin dále ukázaly, že fosforylace na pozici 722 nemá na jaderný import vliv, ale fosforylace serinu 686 vede k jeho inhibici a cytoplazmatické lokalizaci IE62 (Eisfeld *et al.*, 2006). Eisfeld a kolektiv (2006) podotýkají, že fosforylační místo je v blízkosti NLS a předpokládají, že přítomnost negativního náboje interferuje s vazbou k importinu. Prozatím se ale jedná pouze o domněnku a přesný mechanismus, jakým tato inhibice probíhá, není znám.

Konkrétnější představu ovšem máme o roli této regulace v životním cyklu viru. Když byla sledována lokalizace IE62 v buňkách infikovaných VZV, byla v prvních hodinách infekce pozorována jaderná lokalizace proteinu, ovšem 24 hodin po infekci byl IE62 detekován i v cytoplazmě (Kinchington *et al.*, 2000). Jak již bylo uvedeno, IE62 je ve virionech asociován s tegumentem. Současný model maturace virionů VZV uvádí, že nukleokapsidy získávají další obaly včetně tegumentu v cytoplazmě – konkrétně v *trans*-Golgi (Gershon *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2001). Nejnovější poznatky ukázaly, že některé proteiny tegumentu (konkrétně protein ORF21 a ORF22) se mohou vyskytovat v jádře buňky v komplexu s kapsidovými proteiny, což naznačuje, že složení tegumentu může probíhat ve dvou krocích, které se odehrávají v jádře a v *trans*-Golgi (Lebrun *et al.*, 2014). Popsaná regulace lokalizace IE62 by tedy proteinu umožnila plnit různé

funkce v závislosti na fázi infekce – kontrolovat transkripci v časně fázi a podílet se v *trans*-Golgi na sestavení virionů ve fázi pozdní (Kinchington *et al.*, 2001).

4. Vliv fosforylace na jaderný import proteinů virů patřících do čeledi *Papillomaviridae*

Papilomaviry jsou malé neobalené viry s kapsidami s ikosahedrální symetrií. Jejich genom je tvořen kruhovou dsDNA. Replikují se v jádře epitelálních buněk, přičemž v bazálních epitelálních buňkách probíhá latentní replikační cyklus s episomální replikací a v diferencovaných buňkách dochází k lytické replikaci viru. Některé papilomaviry jsou spojovány s transformací buněk. Lidské papilomaviry mohou způsobovat například benigní kožní či genitální bradavice, ale i rakovinu děložního čípku. (Přehledně zpracováno v (Knipe & Howley, 2007)).

4.1 Fosforylace ovlivňuje lokalizaci proteinu E1 lidského papilomaviru typu 11

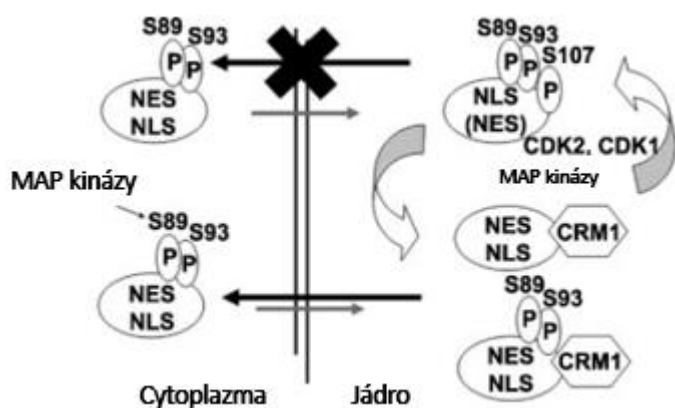
Protein E1 lidského papilomaviru typu 11 (HPV11) plní roli DNA helikázy a je nezbytný pro iniciaci replikace virové DNA (Hughes & Romanos, 1993). E1 může být fosforylován například pomocí cyklin dependentních kináz (Deng *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 1999) a stejně jako u řady dalších proteinů i u něj může fosforylace ovlivňovat jeho funkce (Ma *et al.*, 1999; Schuck *et al.*, 2013).

4.1.1 Fosforylace umožňuje jaderný import proteinu E1

E1 obsahuje jaderný lokalizační signál složený ze dvou částí, které se nacházejí mezi aminokyselinami 83 - 85 a 120 - 123, přičemž pro jaderný import proteinu je nezbytná přítomnost obou těchto sekvencí (Yu *et al.*, 2007). Sledování buněčné lokalizace různě mutovaných proteinů E1 fúzovaných s GFP fluorescenční mikroskopií ukázalo, že pro úspěšný jaderný import E1 je klíčová fosforylace serinu 93 a především serinu 89 (Deng *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2007).

Bylo popsáno, že tyto aminokyseliny mohou být fosforylovány pomocí CDK2 (Deng *et al.*, 2004). Yu a kolektiv (2007) pátrali po dalších kinázách, které by mohly E1 fosforylovat. Díky analýze sekvence E1 zjistili, že v blízkosti C konce proteinu se nachází dvě možná vazebná místa pro MAP kinázy. Posléze ukázali, že MAP kinázy ERK1 a JNK1 mohou fosforylovat E1 *in vitro*. Provedli sérii experimentů, ve kterých kombinovali mutace potenciálních vazebných domén pro MAP kinázy, mutace fúzního proteinu E1 i použití inhibitorů MAP kináz. Zjistili, že ERK1 i JNK1 se skutečně vážou do určených domén. Dále prokázali, že ERK1 může fosforylovat seriny 89 i 93 a JNK1 může fosforylovat serin 89. Ve chvíli, kdy byla zablokována interakce MAP kináz s proteinem E1 nebo fosforylace serinů zprostředkovaná MAP kinázami, byl inhibován jaderný

import proteinu. Tyto výsledky tedy podpořily tvrzení, že fosforylace serinů 89 a 93 hraje zásadní roli v jaderném importu E1 a ukázaly, že tato fosforylace je zprostředkována ERK1 a JNK1.



Obrázek 7: Fosforylace proteinu E1 ovlivňuje jeho lokalizaci v buňce

Fosforylace serinu 89 a serinu 93 pomocí MAP kináz ERK1 a JNK1 je klíčovým krokem jaderného importu proteinu E1 HPV-11. Protein ale kromě NLS obsahuje i NES, který váže receptor CRM1 a způsobuje, že je protein transportován ven z jádra. Aby bylo zabráněno tomuto transportu do cytoplazmy, je nutné, aby byl NES inaktivován fosforylací serinu 107. Ta může být zprostředkována cyklin dependentními kinázami.

Převzato a upraveno podle (Yu *et al.*, 2007).

4.1.2 Fosforylace určuje, zda si E1 udrží jadernou lokalizaci

Na jadernou lokalizaci E1 má kromě již zmíněných modifikací vliv i fosforylace serinu 107. Zde je ovšem nutné zdůraznit, že tato fosforylace neovlivňuje primárně jaderný import, nýbrž zadržení E1 v jádře po jeho translokaci. Přesto se ale jedná o zajímavou ukázkou regulace jaderné lokalizace proteinu prostřednictvím fosforylace. Kromě NLS se totiž na E1 nachází i jaderný exportní signál, který je lokalizovaný mezi aminokyselinami 96 – 115. Pokud je tento NES funkční, převažuje jeho vliv nad vlivem NLS a E1 je po translokaci do jádra transportován zpět do cytoplazmy. Pokud je ovšem serin 107 fosforylován pomocí CDK2, je NES inaktivován a E1 může v jádře plnit svou roli v replikaci (Deng *et al.*, 2004), (Obrázek 7).

4.2 Fosforylace proteinu E1 bovinního papilomaviru ovlivňuje jeho jadernou lokalizaci

Stejně jako E1 HPV11 tak i protein E1 bovinního papilomaviru plní roli DNA helikázy (Sedman & Stenlund, 1998; Seo *et al.*, 1993). Rovněž také podléhá posttranslačním úpravám. Může docházet k jeho ubiquitinilaci (Malcles *et al.*, 2002), sumoylaci (Rangasamy & Wilson, 2000) a bylo popsáno několik potvrzených i pravděpodobných fosforylačních míst, kde může být protein fosforylován například pomocí CDK2 (Cueille *et al.*, 1998; Lentz *et al.*, 1993), PKC (Zanardi *et al.*, 1997) nebo CK2 (Lentz *et al.*, 2002; McShan & Wilson, 1997). Bylo také ukázáno, že různé fosforylace E1 mají vliv na replikaci virové DNA. Tento efekt může být jak pozitivní (Cueille *et al.*, 1998; Lentz *et al.*, 2002; McShan & Wilson, 2000), tak i negativní (Schuck *et al.*, 2013; Zanardi *et al.*, 1997) - jako v případě fosforylace serinu 109 (Zanardi *et al.*, 1997).

4.2.1 Fosforylace inhibuje vazbu E1 a importinů

Protože serin 109 leží v blízkosti NLS E1, který je lokalizován mezi aminokyselinami 84 – 108 (Leng & Wilson, 1994; Lentz *et al.*, 1993), bylo postulováno, že důvod, proč fosforylace tohoto serinu vede k nižší účinnosti replikace virové DNA, by mohl spočívat ve vlivu této modifikace na jaderný import E1. Tato myšlenka se ukázala být správná. Pomocí metody „pulldown“ bylo ukázáno, že NLS E1 může vázat hned několik různých typů importinu α – importiny $\alpha 3$, $\alpha 4$ a $\alpha 5$. Ty posléze zprostředkovávají transport E1 do jádra. Nicméně bylo zjištěno, že fosforylace serinu 109 vazbu s importiny inhibuje a brání jadernému importu proteinu (Bian *et al.*, 2007).

4.2.2 Fosforylace vede k jadernému exportu E1

Zde ale role fosforylace v jaderné lokalizaci E1 bovinního papilomaviru nekončí. Stejně jako u proteinu E1 lidského papilomaviru 11 bylo ukázáno, že fosforylace E1 může mít dopad na jeho jaderný export. Zde se ovšem jedná o opačný případ, než jaký byl popsán v kapitole 4.1.1. Bylo zjištěno, že fosforylace serinu 283, (kterou v buňce zprostředkovává pravděpodobně CDK2), vede k jadernému exportu proteinu. Po exportu z jádra iniciovaném fosforylací je protein importován zpět do jádra a následně může být plynule transportován střídavě mezi jádrem a cytoplazmou. Autoři těchto poznatků předpokládají, že se jedná o regulační proces, který inaktivuje E1 během S fáze buněčného cyklu (Hsu *et al.*, 2007).

5. Vliv fosforylace na jaderný import viru hepatitidy B

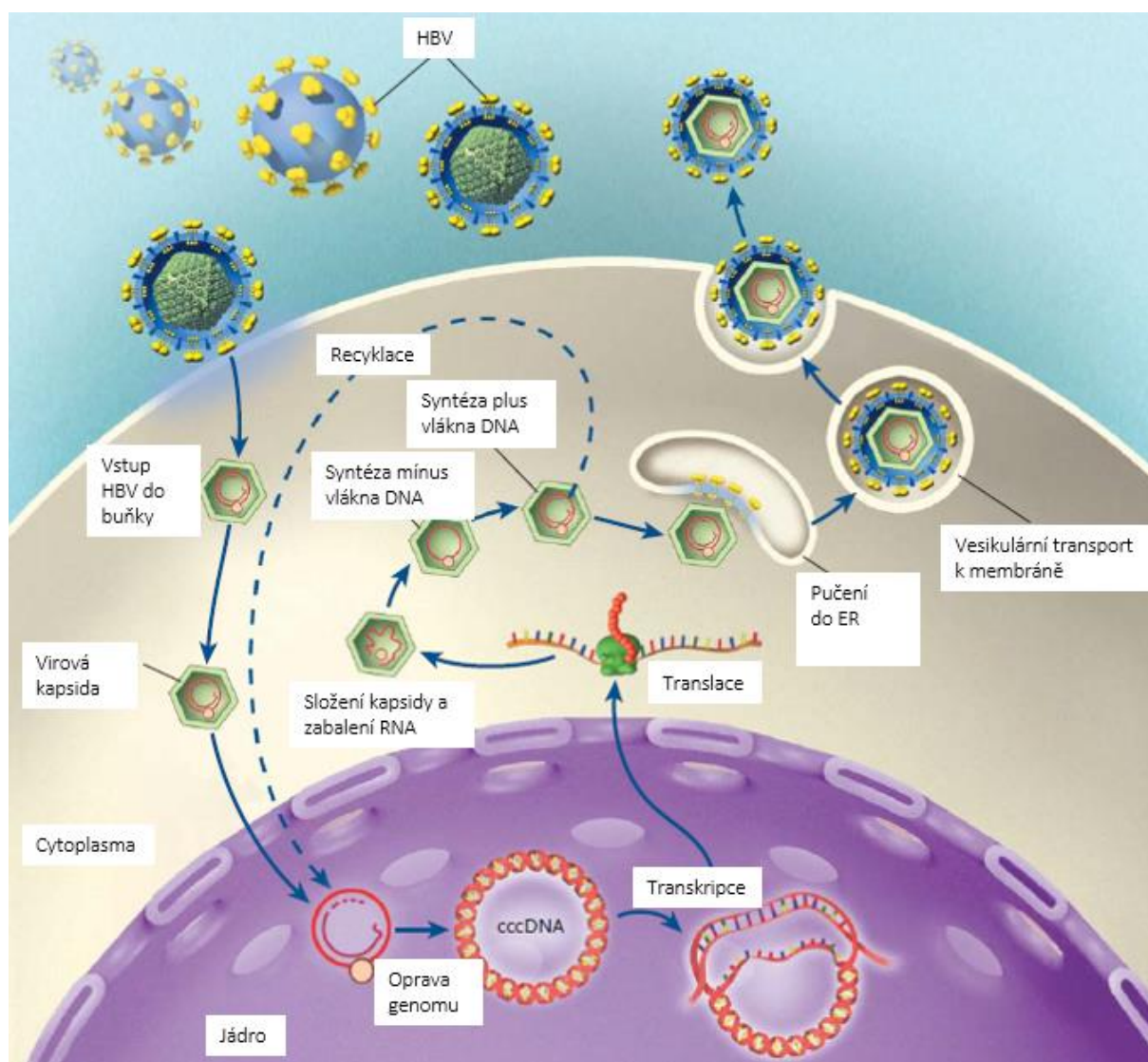
5.1 Virus hepatitidy B

Virus hepatitidy B (HBV) je lidský patogen, kterým je celosvětově infikováno až 350 milionů lidí a více než milion lidí ročně důsledkem této infekce umírá. Replikuje se v hepatocytech a svým hostitelům působí akutní či chronická jaterní onemocnění, která mohou vést až k cirhóze jater, případně vzniku hepatocelulárního karcinomu. Jedná se o malý obalený virus s kapsidou s ikosahedrální symetrií, ve které se nachází genomová DNA navázaná na virovou reverzní transkriptázu. Tato kruhová DNA o velikosti 3,2 kb je dvouvláknová s jednovláknovými úseky.

Virus hepatitidy B je charakteristický svým komplikovaným životním cyklem (Obrázek 8). Po vstupu do buňky jsou nukleokapsidy transportovány k jádru, ve kterém je genom viru dosyntetizován hostitelskými enzymy a převeden na kovalentně uzavřenou cirkulární (ccc) formu. Transkripcí, (kterou zajišťuje hostitelská RNA polymeráza II), vznikají subgenomové RNA, které slouží jako mRNA pro proteiny, ale i tzv. pregenomová RNA (pgRNA), která je v cytoplazmě zabalena do kapsid. Tento RNA intermediát je virovou polymerázou převeden reverzní transkripcí

do genomové DNA. Nukleokapsidy jsou pak buďto obaleny v endoplazmatickém retikulu a uvolněny z buňky, anebo takzvaně recyklovány, kdy znovu dopraví svůj genom do jádra téže buňky k další transkripci.

Kapsida viru hepatitidy B je tvořena kapsidovým proteinem nazývaným protein core (HBc). HBc je protein velký 21 kDa tvořený 183 aminokyselinami. Jeho N koncová doména – konkrétně aminokyselinové zbytky 1 až 149 - plní strukturní roli při složení kapsidy. C koncová doména složená z 34 aminokyselin není pro sestavení nukleokapsidy nezbytná a má jiné než strukturní funkce. (Přehledně zpracováno v (Seeger & Mason, 2000)). V C koncové doméně byla lokalizována RNA a DNA vazebná doména proteinu (Hatton *et al.*, 1992), a několik aminokyselinových zbytků,



Obrázek 8: **Životní cyklus viru hepatitidy B**

Po vstupu do buňky jsou virové částice transportovány k jádru, ve kterém dochází k opravě genomu na kovalentně uzavřenou cirkulární DNA (cccDNA). Genom je pak přepsán do několika mRNA, které jsou překládány do proteinů a do pregenomové RNA, která je v cytoplasmě balena do kapsid a přepsána reverzní transkripcí do DNA. Takto vzniklá částice může získat obal pučením do endoplazmatického retikula a opustit buňku, nebo být recyklována a znovu dopravit svůj genom do jádra buňky.

Převzato a upraveno podle přehledného článku (Ganem & Prince, 2004).

kteřé mohou sloužit jako substrát pro fosforylaci (Jung *et al.*, 2014; Liao & Ou, 1995). Navíc bylo ukázáno, že argininové shluky na C konci proteinu mohou ovlivňovat uspořádání nukleové kyseliny v kapsidě viru. Tato chaperonová aktivita závisí na bazických aminokyselinách C konce proteinu a je regulovatelná jeho fosforylací (Chu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012).

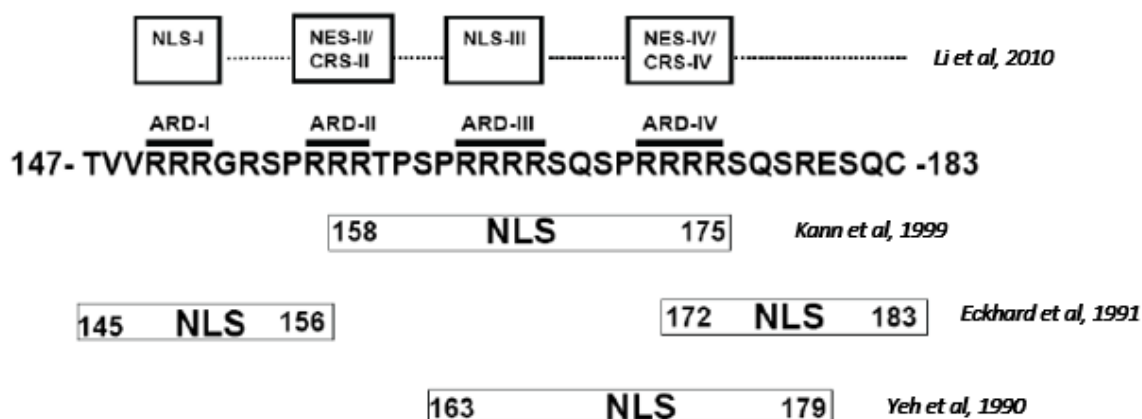
Jak tedy již bylo naznačeno, HBc neplní pouze strukturní roli. V průběhu životního cyklu viru kontroluje hned několik jeho kroků. Regulační funkce HBc jsou často zprostředkovány změnou fosforylačního stavu proteinu. V průběhu cyklu podléhá kapsidový protein dynamickému procesu fosforylace a defosforylace, který ovlivňuje například syntézu virové DNA (Jung *et al.*, 2014; Lan *et al.*, 1999; Lewellyn & Loeb, 2011) nebo zabalení pgRNA do kapsid (Gazina *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2011; Lan *et al.*, 1999; Le Pogam *et al.*, 2005). Kromě toho, jak bude dále popsáno, je na fosforylaci HBc závislé úspěšné dopravení virového genomu i samotného proteinu do jádra buňky.

5.2 Vliv fosforylace kapsidového proteinu na jaderný import HBV

Poté, co bylo ukázáno, že kapsidový protein viru hepatitidy B rovněž vstupuje do jádra (McLachlan *et al.*, 1987), se C konec proteinu, který obsahuje shluky argininu připomínající NLS jiných proteinů, stal předmětem výzkumu hned několika skupin, které usilovaly o charakterizaci jaderného lokalizačního signálu HBc.

Jejich práce, založené mimo jiné na srovnávání lokalizace různě mutovaných forem proteinu, popsaly přítomnost jaderného lokalizačního signálu, nicméně se neshodly na jeho přesné pozici (Eckhardt *et al.*, 1991; Kann *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2010; Yeh *et al.*, 1990), (Obrázek 9). Li a kolektiv (2010) usuzují, že tyto neshody mohou být způsobeny tím, že práce byly provedeny v rozdílných systémech. Byla však publikována i studie zkoumající buněčnou lokalizaci mutovaných HBc proteinů fúzovaných s GFP. Její autoři uvádějí, že na C konci proteinu není přítomen žádný jaderný lokalizační signál (Weigand *et al.*, 2010). Tato práce je tak v přímém rozporu s tím, co pozorovaly ostatní skupiny. Možné vysvětlení pro pozorování Weiganda a kolektivu by mohlo být, že lokalizace těchto proteinů byla ovlivněna přítomností GFP, nebo že funkce NLS HBc není podmíněna pouze jeho sekvencí – roli by mohla hrát například některá posttranslační modifikace nebo vyšší struktura proteinu. Přítomnost dalšího faktoru, který dosud nebyl brán v potaz, by také mohla vysvětlit dosavadní rozporuplné výsledky. Z prozatím publikovaných dat se můžeme domnívat, že C konec proteinu pravděpodobně jaderný lokalizační signál obsahuje, ovšem jeho přesná pozice ještě musí být potvrzena.

První data o vlivu fosforylace na jaderný import HBc ukazovala, že fosforylace serinových zbytků C konce vede k cytoplazmatické lokalizaci proteinu (Liao & Ou, 1995). Nicméně tato pozorování nelze vztáhnout na proteiny HBc tvořící nukleokapsidu, protože tato původní práce nebrala v potaz uspořádání kapsidy viru, kde, jak bylo ukázáno, je C konec proteinu lokalizován



Obrázek 9: **Navrhované pozice NLS**

Mapa publikovaných možných pozic NLS ukazuje, že výsledky skupin hledajících jaderný lokalizační signál kapsidového proteinu HBV se dramaticky liší. Přerušovaná linie u výsledku Li a spolupracovníků značí, že konkrétní hranice mezi domnělými NLS a NES dosud nejsou určeny. Nicméně ani jaderné lokalizační signály navrhované zbylými skupinami nejsou přesně definované – uvedená rozmezí označují sekvenci, do které by měl NLS alespoň částečně zasahovat.

U Eckharda a kolektivu i u Li a kolektivu jsou na obrázku znázorněny dva NLS. U Eckharda a spolupracovníků by se mělo jednat o dva nezávislé signály, oproti tomu Li a kolektiv nahlásili dva vzájemně závislé NLS.

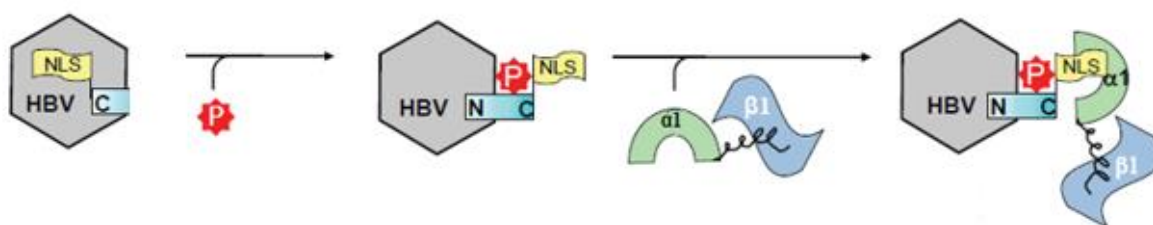
Převzato a upraveno podle (Li *et al.*, 2010).

uvnitř nukleokapsidy (v blízkosti póru v kapsidě) a nepřístupný pro buněčné faktory (Roseman *et al.*, 2005; Zlotnick *et al.*, 1997). Jeho pozice ovšem není rigidní, přechodně dochází k jeho expozici na povrch nukleokapsidy. Byly popsány dva různé způsoby, jak k tomu může dojít. První navrhuje, že C konec je dočasně vystaven ve chvíli, kdy dojde k částečné změně konformace kapsidy - například vlivem teplotní změny (Hilmer *et al.*, 2008). Později ale bylo popsáno, že tento model sám o sobě nemůže vysvětlit vystavení C domény v takové míře, v jaké k němu dochází (Chen *et al.*, 2011). Druhá možnost říká, že se C konec dostává na povrch tak, že projde pórem v kapsidě. Tyto dva modely se vzájemně nevylučují (Chen *et al.*, 2011). Díky této dynamice tak HBc může v průběhu životního cyklu viru plnit funkce jak uvnitř tak vně kapsidy.

Jedna z těchto funkcí je zajištění transportu virového genomu i samotných proteinů HBc do jádra. Byly provedeny experimenty, které sledovaly jaderný transport *in vitro* syntetizovaných HBc částic. S použitím hepatocytů, jejichž cytoplazmatická membrána byla rozrušena digitoninem, bylo ukázáno, že k tomu, aby kapsidové proteiny mohly být dopraveny k jádru, musí nejprve dojít k jejich fosforylaci kinázou uvnitř kapsidy (Kann *et al.*, 1999). Virus ovšem nekóduje vlastní kinázu a předpokládá se, že v kapsidě nese kinázu pocházející z hostitele. Do dnešního dne ale nebylo uspokojivě vyřešeno, která kináza, či kinázy jsou přítomny v kapsidě a HBc fosforylují. V minulých letech bylo na toto téma publikováno mnoho prací, jejichž závěry se rozcházejí. Jejich autoři například ukázali, že HBc mohou fosforylovat kinázy SRPK a SRPK2 (Daub *et al.*, 2002), PKA (Enomoto *et al.*, 2006), GAPD-PK (Duclos-Vallée *et al.*, 1998) nebo PKC, u které dokonce Kann & Gerlich (1994) pomocí imunodetekce ukázali její přítomnost v kapsidě. Tomuto tvrzení ovšem

oponují jiní autoři, kteří uvádějí, že PKC nesplňuje charakteristiky, které pro kapsidovou kinázu sami popsali (Daub *et al.*, 2002; Kau & Ting, 1998). Nejnovější data (získaná pokusy zahrnujícími imunodetekci a využití inhibitorů kináz), ukazují, že CDK2 je minimálně jednou z kináz přítomných v kapsidě, a navíc bylo ukázáno, že může v *in vitro* a *in vivo* systémech fosforylovat C konec HBc. Nicméně není vyloučena ani role jiné kinázy (Ludgate *et al.*, 2012).

Fosforylace HBc vede ke konformační změně, která je spojená s vystavením C koncové domény proteinu s NLS na povrch kapsidy. Po expozici NLS dochází k jeho vazbě na importin α , který interaguje s importinem β a komplex je transportován k jádru, kde dochází k jeho navázání na jaderný pór (Kann *et al.*, 1999), (Obrázek 10). Koimunoprecipitace HBc částic ukázala, že vazba na NPC je zprostředkována N koncovou doménou proteinu, která se s vysokou afinitou váže na protein jaderného póru Nup153 (Schmitz *et al.*, 2010).



Obrázek 10: Fosforylace HBc umožňuje jaderný import nukleokapsidy HBV

Po fosforylaci HBc projde kapsida konformační změnou, během které se C konec proteinu dostane na povrch kapsidy, čímž se jaderný lokalizační signál zpřístupní vazbě importinů α a β . Ty pak zprostředkují transport do jádra.

Převzato a upraveno podle přehledného článku (Nardozi *et al.*, 2010b).

Byla navržena hypotéza, že expozice C konce proteinu je umožněna v průběhu reverzní transkripce, kdy C konec přestává být vyžadován na stabilizaci RNA, která je degradována (Chen *et al.*, 2011; Kann *et al.*, 1999). Tuto myšlenku podporují pozorování, že zatímco u nematurovaných částic dochází k vystavení C konce proteinu na povrch kapsidy pouze v malém procentu případů (Guo *et al.*, 2010; Ludgate *et al.*, 2012; Rabe *et al.*, 2003), u maturovaných dochází k masivní expozici C konce (Guo *et al.*, 2010; Rabe *et al.*, 2003). Nemělo by ovšem být opomenuto, že tato data byla zpochybněna teoretickým modelem zabývajícím se strukturou nukleokapsidy HBV, který sice souhlasí s tím, že u nematurovaných částic by měl být C konec vystaven pouze u části partikulí, na druhou stranu ale předpokládá, že C konce maturovaných partikulí by měly být lokalizovány uvnitř částice. Nicméně tyto závěry vychází z čistě teoretického modelu a prozatím chybí experimentální výsledky, které by je podporovaly (Meng *et al.*, 2011).

Logicky, další krok po navázání na jaderný pór musí být uvolnění genomu do karyoplazmy buďto z NPC nebo přímo v jádře. Bylo popsáno, že ačkoliv velikost kapsid je na samé hranici velikostního limitu NPC, částice HBV mohou být importovány do jádra v celku (Panté & Kann, 2002). Další porovnávání maturovaných a nematurovaných částic ukázalo, že po jejich inkubaci

s buňkami s rozrušenou cytoplazmatickou membránou – a tedy přístupnými jádry, jsou pouze maturované částice schopny dostat se do jádra a uvolnit genom. Oproti tomu nematurované částice zůstaly zadrženy v jaderném koši na karyoplazmatické straně NPC (Rabe *et al.*, 2003). Právě zde pravděpodobně dochází k částečnému rozložení maturovaných kapsid, ze kterých vznikají dimery HBc, které pak spolu s DNA difúzí pronikají dále do nukleoplazmy (Rabe *et al.*, 2009). Translokace těchto dimerů je umožněna tím, že jejich počet zásadně převyšuje počet proteinů Nup153, které tak v jaderném koši nadále zadržují pouze malý podíl dimerů (Schmitz *et al.*, 2010).

Rabe a kolektiv (2003) vyslovili myšlenku, že skutečnost, že k částečnému rozložení kapsidy dochází pouze u maturovaných částic, může souviset s vazbou proteinů na nukleovou kyselinu. Domnívají se, že syntéza dsDNA může vést k oslabení struktury kapsidy a umožnit její rozložení. K stejnému závěru dospěla i skupina, která ukázala, že s maturací nukleokapsid dochází k jejich destabilizaci (Cui *et al.*, 2013). Tuto hypotézu podporují jednak data prokazující, že vazba RNA stabilizuje kapsidu viru (Newman *et al.*, 2009), ale také data ukazující, že vazba dsDNA má na kapsidu destabilizující efekt, a dokonce potenciál ji deformovat (Dhason *et al.*, 2012).

6. Vliv fosforylace na jaderný import proteinů viru influenza A

6.1 Virus influenza A

Virus influenza A, známý i pod označením virus chřipky, patří do čeledi *Orthomyxoviridae*. Jde o obalený virus se segmentovaným genomem, který je tvořen jednovláknovou RNA komplementární ke kódující sekvenci. Jeho viriony obsahují nukleokapsidy s helikální symetrií. Jde o jeden z mála virů s RNA genomem, které jsou replikovány v jádře hostitelské buňky.

Po vstupu do buňky a průchodu endozomálním systémem se uvolní virové nukleokapsidy, které jsou transportovány do jádra. Zde probíhá transkripce a replikace virového genomu. Po translaci virových proteinů potřebných pro složení nukleokapsid jsou tyto opět transportovány do jádra, kde dochází k sestavení nových nukleokapsid. Ty jsou posléze transportovány k plazmatické membráně, kde proběhne složení virových partikulí, které získají obal pučením z plazmatické membrány. (Přehledně zpracováno v (Boulo *et al.*, 2007)).

6.2 Jaderný import virového genomu je možná regulován fosforylací nukleoproteinu

Nukleoprotein (NP) váže virovou RNA a je součástí nukleokapsid. V buňce může být transportován mezi jádrem a cytoplazmou (Neumann *et al.*, 1997) a vše nasvědčuje tomu, že regulace transportu NP je komplexní proces. Nejenže nově syntetizované NP musí být transportovány do jádra, kde dochází k složení nových nukleokapsid, ale také bylo prokázáno, že lokalizační sekvence na NP jsou klíčové pro transport nukleokapsid buňkou. Po vstupu viru do buňky a úniku nukleokapsidy

z endozomu zprostředkovává NP transport virové RNA k replikaci do jádra buňky (Cros *et al.*, 2005; O'Neill *et al.*, 1995). Navíc po sestavení nových nukleokapsid, jsou tyto transportovány ven z jádra, a přestože obsahují NP, u nově syntetizovaných nukleokapsid nedochází k jadernému importu (Whittaker *et al.*, 1996).

Na NP byla popsána přítomnost celé řady sekvencí, které mohou mít vliv na buněčnou lokalizaci proteinu. Většina těchto sekvencí byla objevena sledováním lokalizace různě mutovaných peptidů a v literatuře lze najít rozpory ohledně toho, která sekvence skutečně hraje roli v rámci celého proteinu, popřípadě je nejvýznamnější (Bullido *et al.*, 2000; Ketha & Atreya, 2008; Neumann *et al.*, 1997; Ozawa *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2012). Během posledních let ale několik skupin popsalo, že hlavní roli v jaderném importu NP i nukleokapsid hraje NLS1, nacházející se mezi prvními 13 aminokyselinami N konce proteinu, který je dominantní nad ostatními lokalizačními sekvencemi (Cros *et al.*, 2005; Neumann *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2007a; Wu & Panté, 2009). Rovněž bylo potvrzeno, že NLS1 váže importin α (Wang *et al.*, 1997).

Při studiu transportu virových nukleokapsid bylo navíc zjištěno, že během importu do jádra vystavují NLS1 na svém povrchu (Wu *et al.*, 2007b; Wu & Panté, 2009), ovšem během exportu nově vzniklých nukleokapsid z jádra do cytoplazmy je NLS1 maskován. Proto kapsidy nejsou znovu transportovány do jádra. Bylo usouzeno, že maskování NLS1 je pravděpodobně způsobeno posttranslační modifikací NP (Wu & Panté, 2009).

Touto modifikací by mohla být fosforylace. Bylo prokázáno, že NP může být fosforylován (Arrese & Portela, 1996; Hutchinson *et al.*, 2012; Kistner *et al.*, 1989). Navíc v buňkách, ve kterých probíhala exprese nukleoproteinu, bylo ukázáno, že fosforylace má vliv na buněčnou lokalizaci NP. Přidání inhibitoru buněčných kináz vyústilo ve zvýšené množství NP v jádře. Oproti tomu v buňkách se stimulatorem fosforylace byl NP pozorován v cytoplazmě (Bui *et al.*, 2002; Neumann *et al.*, 1997; Palamara *et al.*, 2005).

Bullida a kolektiv (2000) zaujalo, že fosforylovatelný serin 3 (Arrese & Portela, 1996), který je součástí NLS1, je konzervovaný v téměř všech sekvenovaných nukleoproteinech. Proto se rozhodli zjistit, zda s importem NP může souviset fosforylace tohoto serinu. Pomocí substitučních mutací proteinu NP fúzovaného s GFP zjistili, že fosforylace serinu 3 skutečně vede k zvýšené cytoplazmatické lokalizaci NP a předpokládali, že tato fosforylace snižuje účinnost NLS1. Přesný mechanismus, jak k tomu dochází, dosud nebyl popsán.

Fosforylace serinu 3 by tak mohla být faktorem, který brání, aby byly nově vzniklé nukleokapsidy transportovány zpět do jádra. Jedná se ale pouze o domněnku, pro kterou zatím chybí důkazy.

6.3 Jaderný import matrixového proteinu závisí na jeho fosforylaci

Dalším proteinem viru influenza A, u kterého fosforylace ovlivňuje jeho jaderný import, je matrixový protein (M1). M1 je transportován do jádra buňky, kde se podílí na regulaci virové transkripce (Ye *et al.*, 1989) a umožňuje export nově vzniklých nukleokapsid z jádra do cytoplazmy (Bui *et al.*, 2000). Již delší dobu je známo, že tento protein podléhá fosforylaci (Gregoriades *et al.*, 1984; Hutchinson *et al.*, 2012; Reinhardt & Wolff, 2000) a bylo pozorováno, že hyperfosforylovaná forma proteinu je lokalizována v jádře (Whittaker *et al.*, 1995). Nejnovější výzkum přinesl důkazy o tom, jak fosforylace souvisí s funkcí a buněčnou lokalizací M1.

Jedním z fosforylačních míst M1 je i tyrosin na pozici 132. Substituční mutace tyrosinu 132 ukázaly, že fosforylace této aminokyseliny je nezbytná pro jaderný import proteinu, (který je zprostředkován NLS mezi aminokyselinami 101 – 105 (Ye *et al.*, 1995)). Imunoprecipitací bylo zjištěno, že fosforylace ovlivňuje interakci NLS s receptorem. Ztráta fosforylace snížila schopnost proteinu M1 vázat importin α 1 o celých 80 %. Autoři těchto poznatků se domnívají, že tento efekt může být způsoben tím, že změna náboje na pozici 132 způsobuje konformační změnu M1, která zvyšuje afinitu proteinu k importinu α .

Další důkaz o vlivu fosforylace přinesly experimenty s různými inhibitory kináz. Jaderný import M1 byl úspěšně zablokován použitím inhibitoru fosforylace zprostředkované kinázami JAK (Wang *et al.*, 2013). Zda ale některá kináza JAK skutečně fosforyluje M1 ještě musí být prokázáno.

6.4 Vliv fosforylace na lokalizaci matrixového proteinu viru influenza B

Viry influenza A a influenza B jsou si blízké příbuzné a mají stejnou strukturu. Také se předpokládá, že jejich proteiny mají stejné funkce. Nicméně odpovídající si matrixové proteiny M1 a BM1 mají pouze 30% sekvenční identitu a nesdílejí domény zajišťující transport mezi cytoplazmou a jádrem buňky. Proto se skupina, která studovala jaderný import M1 rozhodla zaměřit i na protein BM1 ve snaze zjistit, jaká je jeho buněčná lokalizace a funkce (Cao *et al.*, 2014b).

Popsali, že BM1 stejně jako M1 může být transportován mezi jádrem a cytoplazmou a to díky dvěma jaderným exportním signálům a NLS složenému ze dvou částí, který se nachází mezi aminokyselinami 76 – 94. Dále pomocí hmotnostní spektrometrie identifikovali 5 fosforylačních míst BM1 (z toho dvě byla objevena již dříve (Hutchinson *et al.*, 2012)). Dvě z popsaných fosforylačních míst, konkrétně threonin 80 a serin 84 jsou součástí NLS BM1. Aby autoři práce prozkoumali možný dopad fosforylace těchto míst, připravili fluorescenčně značené peptidy obsahující NLS s jejich substitučními mutacemi. Sledovali lokalizaci takto připravených peptidů v buňce a zjistili, že fosforylace na pozicích 80 a 84 je potřebná pro jejich jadernou lokalizaci. Nicméně tyto výsledky se nepodařilo zopakovat i s celými proteiny, na jejichž lokalizaci neměla ztráta fosforylace threoninu 80 a serinu 84 vliv. Jak ale ukázala metoda „pulldown“ i tyto proteiny

byly ztrátou fosforylace poznamenány a vázaly importin α s nižší afinitou. Možné vysvětlení těchto výsledků je, že fosforylované aminokyseliny 80 a 84 se podílí na jaderném importu vazbou importinu, ale v rámci celého proteinu mohou být v případě potřeby zastoupeny.

Autoři dále usuzují, že transport BM1 mezi cytoplazmou a jádrem buňky pravděpodobně stejně jako u M1 hraje roli v jaderném exportu nukleokapsid (Cao *et al.*, 2014b).

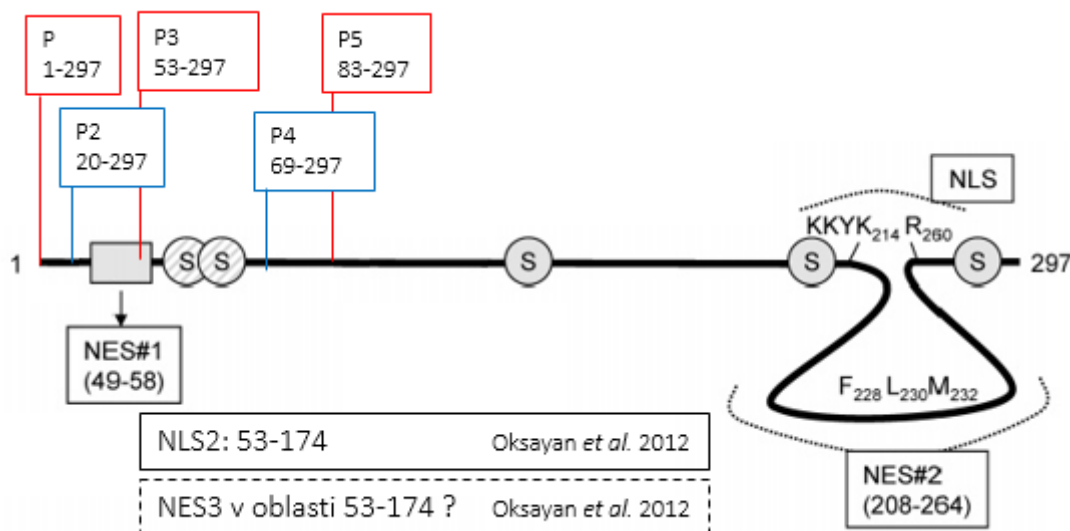
7. Vliv fosforylace na jaderný import proteinu P viru vztekliny

Vzteklina je zoonotické onemocnění napadající nervový systém, na které každý rok umírají desítky tisíc lidí. Virus, který ji způsobuje, patří do čeledi *Rhabdoviridae*, je obalený, má šroubovitě uspořádanou kapsidu a jeho genom je tvořen jednovláknovou RNA komplementární ke kódující sekvenci. Mezi ostatními viry rozebíranými v této práci je unikátní tím, že se nereplikuje v jádře. (Přehledně zpracováno v (Yousaf *et al.*, 2012)).

I přesto, že replikace viru vztekliny probíhá v cytoplazmě, izoformy jeho proteinu P – kofaktoru virové RNA polymerázy se mohou nacházet i v jádře hostitelské buňky. Protein P se vyskytuje v pěti izoformách, kde P představuje úplnou verzi proteinu a izoformy P2-P5 formy proteinu zkrácené o část N konce proteinu P. Nejdelší formy P a P2 se nachází v cytoplazmě hostitelské buňky, ale formy P3 – P5 byly pozorovány převážně v jádře (Chenik *et al.*, 1995). Transport izoform proteinu P mezi cytoplasmou a jádrem je důležitý pro inhibici buněčné antivirové odpovědi zprostředkované interferony (Blondel *et al.*, 2002; Vidy *et al.*, 2005, 2007). Protein P obsahuje několik sekvencí, které určují jeho lokalizaci v buňce. Přesný regulační proces, který určuje, která z těchto sekvencí bude mít rozhodující vliv, ještě musí být popsán, ale dosud získané informace ukazují, že svou roli sehrává i fosforylace proteinu – protein P může být fosforylován na několika cílových místech pro buněčné kinázy PKC a RVPK (Gupta *et al.*, 2000).

Ze sekvencí určujících lokalizaci proteinu P byl jako první popsán NLS na C konci proteinu a dva jaderné exportní signály. NES1 je lokalizován takřka na samotném N konci proteinu mezi aminokyselinami 49 – 58, je přítomen pouze u izoform P a P2 a rozhoduje o jejich cytoplazmatické lokalizaci (Pasdeloup *et al.*, 2005). NES2 se nachází na C konci proteinu mezi aminokyselinami 208 – 264 (Moseley *et al.*, 2007) a prakticky od sebe odděluje dvě části NLS, pro jehož aktivitu jsou klíčové aminokyseliny na pozici 214 a 260 (Pasdeloup *et al.*, 2005). Ty se ve složeném proteinu vyskytují v těsné blízkosti (Mavrakis *et al.*, 2004), (Obrázek 11).

Bylo ukázáno, že fosforylace serinu 210 proteinu P3 pomocí PKC inhibuje jeho jadernou lokalizaci. Tento efekt mohl být z větší části zvrácen, pokud byl v buňkách zablokován jaderný export. Zatím se proto zdá, že fosforylace neovlivňuje jaderný import jako takový, ale mění



Obrázek 11: **Lokalizační sekvence izoform proteinu P viru vztekliny**

Protein P se vyskytuje v pěti izoformách. P je úplná verze proteinu a formy P2 – P5 jsou zkráceny o různě dlouhou část N konce. Protein obsahuje několik lokalizačních sekvencí. Sekvence na C konci jsou unikátní tím, že NLS je přerušen jaderným exportním signálem. Ve složeném proteinu se ale části NLS vyskytují v těsné blízkosti. Na proteinu se nachází také několik fosforylačních míst značeným písmenem S. V červených a modrých rámečcích jsou uvedeny velikosti a N konce jednotlivých izoform číselováním aminokyselinových zbytků podle nejdelší formy P.

Převzato a upraveno podle (Moseley *et al.*, 2007).

rovnováhu mezi vlivem NLS a NES2. Jednalo by se tak o stejnou situaci jako u proteinu E1 bovinního papillomaviru (viz kapitola 4.2.2). Nicméně s ohledem na skutečnost, že fosforylační místo, NLS i NES2 jsou součástí jediné globulární domény, není vyloučeno, že fosforylace ovlivňuje i funkci NLS. Jak bylo rozebráno dříve, změna náboje NLS může vést například ke změně schopnosti vázat importiny a rovněž zatím neznáme přesný způsob, jak fosforylace zesiluje účinnost NES - je možné, že dochází ke změně konformace, která by pravděpodobně ovlivnila i NLS (Moseley *et al.*, 2007).

O několik let později byl popsán další NLS (NLS2) na N konci proteinu (mezi aminokyselinami 53 – 174), rozpoznávaný komplexem importinů α a β . Tento NLS by měl být určující pro jadernou lokalizaci izoformy P3 (Oksayan *et al.*, 2012). Mělo by být zmíněno, že dříve byla publikována práce uvádějící, že v této části proteinu se žádný NLS nenachází. Tento závěr vycházel z experimentů s krácenými proteiny P fúzovanými s GFP (Pasdeloup *et al.*, 2005). Je možné, že lokalizace těchto proteinů byla ovlivněna přítomností GFP. Oksayan a kolektiv (2012) se dále domnívají, že na N konci proteinu se nachází další dosud nepopsaný NES (NES3), jehož přesná pozice ještě musí být určena (Obrázek 11). Pozice nově identifikovaného NLS i domnělého NES překrývá několik fosforylačních míst. Zda ale mohou být tyto nově popsané signální sekvence ovlivněny fosforylací, a jaké jsou přesné vztahy mezi všemi těmito lokalizačními sekvencemi, ještě musí být určeno.

8. Vliv fosforylace na jaderný import proteinů virů patřících do čeledi *Retroviridae*

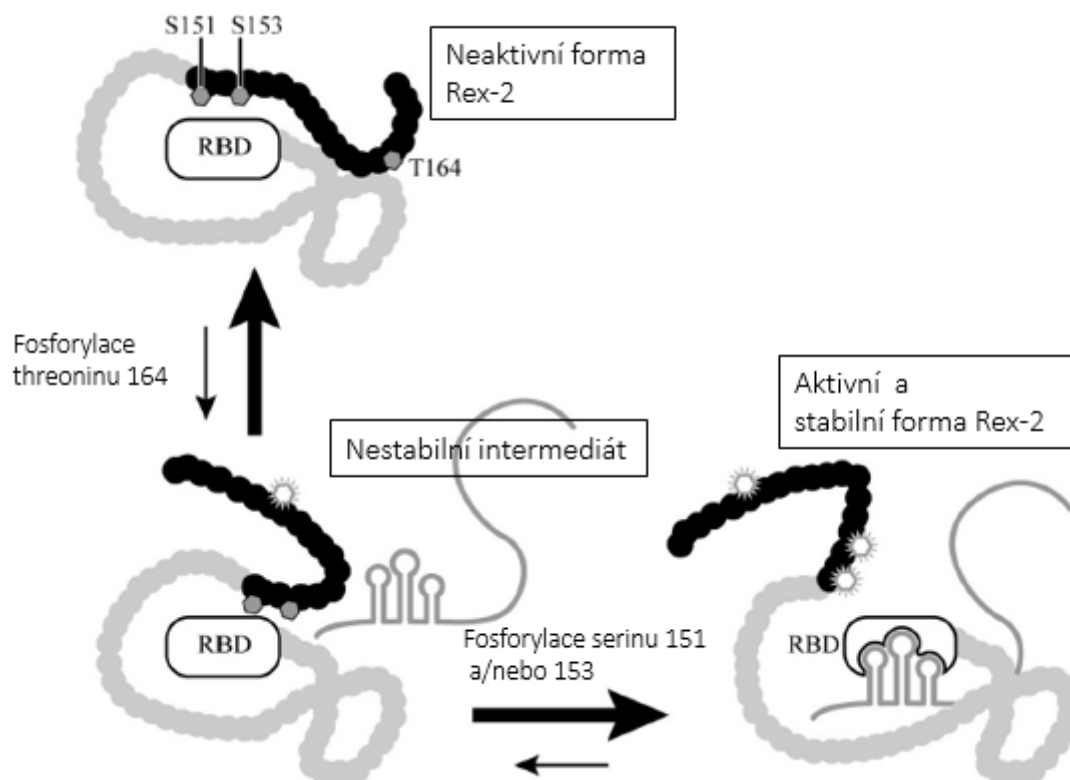
Do čeledi *Retroviridae* jsou řazeny viry charakteristické svým životním cyklem. Virové částice obsahují genomovou RNA, která je ovšem v hostitelské buňce pomocí virové reverzní transkriptázy převedena na DNA a integrována do hostitelské chromozomální DNA. Tato forma virového genomu se nazývá provirus a slouží jako templát pro vznik nové genomové RNA, (která slouží též jako mRNA) a další jedné či více mRNA pro virové proteiny. Z takto vzniklé genomové RNA a proteinů jsou pak skládány nové virové částice. (Přehledně zpracováno v (Knipe & Howley, 2007)).

8.1 Fosforylace umožňuje jaderný import proteinu Rex-2 viru HTLV-2

Vůbec prvním objeveným lidským retrovirem byl v roce 1980 virus HTLV-1 (Human T-cell leukemia virus type 1) (Poiesz *et al.*, 1980), spojovaný s řadou nemocí včetně leukémie. Blízkým příbuzným HTLV-1 je virus HTLV-2 (Human T-cell leukemia virus type 2). I u tohoto viru byla popsána možná spojitost se závažnými onemocněními (Hjelle *et al.*, 1992; Zehender *et al.*, 2002). HTLV-2 kóduje protein Rex-2, u kterého byla objevena souvislost mezi jaderným importem proteinu a jeho fosforylací.

Rex-2 se vyskytuje ve dvou formách (Shima *et al.*, 1986), které se od sebe liší mírou fosforylace (Green *et al.*, 1991). V neaktivní konformaci má protein pouze 2 fosforylační místa, zatímco aktivní konformace proteinu má fosforylačních míst celou řadu (Kesic *et al.*, 2009), a na rozdíl od neaktivní formy může vázat RNA (Green *et al.*, 1992). Tato schopnost je zásadní pro funkci proteinu. Rex-2 se totiž podílí na regulaci exprese virových proteinů na posttranskripční úrovni. Váže nesestřížené nebo neúplně sestřížené virové transkripty a zprostředkovává jejich transport z jádra buňky do cytoplazmy (Kusuhara *et al.*, 1999; Ohta *et al.*, 1988).

Rex-2 tedy plní svou funkci v jádře hostitelské buňky. Substituční mutace zvolených aminokyselin za nefosforylovatelný alanin nebo fosfomimetické aminokyseliny ukázaly, že jaderný import proteinu souvisí s fosforylací serinů na pozicích 151 a 153 (Narayan *et al.*, 2003) a threoninu na pozici 164, přičemž klíčová pro úspěšný jaderný import proteinu Rex-2 je fosforylace serinu 151 (Kesic *et al.*, 2009). Narayan a kolektiv (2003) vyslovili předpoklad, že tento efekt pravděpodobně souvisí s další prokázanou rolí fosforylace těchto aminokyselin – stabilizací aktivní konformace Rex-2. Jak bylo uvedeno, Rex-2 se v buňce vyskytuje ve dvou formách. Bylo ukázáno, že přechod do aktivní formy je umožněn fosforylací threoninu 164. Ta způsobí konformační změnu, která vede ke vzniku nestabilního intermediátu. Pokud následně dojde i k fosforylaci serinu 151 nebo 153,



Obrázek 12: **Fosforylace proteinu Rex-2 HTLV-2 ovlivňuje jeho konformaci**

Fosforylace threoninu 164 vede ke vzniku nestabilního intermediátu. Fosforylace tohoto intermediátu na pozici 151 nebo 153 vede k další konformační změně a vzniku aktivní formy proteinu.

RBD v obrázku značí RNA vazebnou doménu.

Převzato a upraveno podle: (Kesic *et al.*, 2009).

zaujme Rex-2 svou aktivní konformaci. Pokud ne, protein se vrátí zpět do neaktivní konformace (Kesic *et al.*, 2009; Narayan *et al.*, 2001), (Obrázek 12). Zatím nebylo prokázáno, která kináza tyto aminokyseliny fosforyluje, ale podle predikce na základě sekvence by se mohlo jednat o CK1 (Kesic *et al.*, 2009).

Narayan a kolektiv (2003) usuzují, že konformační změna je pro jaderný import Rex-2 nezbytná a navrhuje, že je možné, že vede k vystavení domény, která je důležitá pro zprostředkování jaderného importu (například interakcí s potřebným buněčným faktorem).

8.2 Vliv fosforylace na jaderný import preintegračního komplexu viru HIV

HIV neboli virus lidské imunitní nedostatečnosti je obalený virus, který má konickou kapsidu a jeho genom je tvořen dvěma kopiemi kódující ssRNA. Genom je v cytoplazmě hostitelské buňky převeden na dsDNA. Tato DNA je navázána na proteiny a tvoří preintegrační komplex, který je transportován do jádra buňky. (Přehledně zpracováno v (Knipe & Howley, 2007)). V jeho transportu do jádra hraje roli díky svému NLS virový matrixový protein (MA) (Bukrinsky *et al.*,

1993; Haffar *et al.*, 2000), protein, který se dále podílí například na skládání a pučení nových virových částic (Dorfman *et al.*, 1994; Wang & Barklis, 1993).

Skupina zabývající se vlivem fosforylace na jaderný import preintegračního komplexu zprostředkovaný matrixovým proteinem, publikovala několik prací, ve kterých uvádí, že MA může být fosforylován na tyrosinu na samotném C konci proteinu. K této fosforylaci dochází během pučení nově vzniklých virových částic z plazmatické membrány. Zprostředkovává ji dosud nespecifikovaná buněčná kináza, která je asociována s virovým obalem. Pomocí imunoprecipitace bylo zjištěno, že tato fosforylace umožňuje MA vázat virový protein integrázu a podílet se na jaderném importu preintegračního komplexu (Camaur *et al.*, 1997; Gallay *et al.*, 1995a, b).

Tento model byl ovšem zpochybněn jinými vědeckými skupinami. Bukrinskaya *et al.* (1996) sice popsali, že inhibice fosforylace MA blokuje jeho jaderný import a replikaci HIV, ovšem stejně jako Freed *et al.* (1997) pozorovali, že substituce tyrosinu na C konci proteinu za nefosforylovatelnou aminokyselinu nemá na virovou replikaci žádný dopad.

Autoři původních dat tyto rozdíly připisují odlišnosti systémů, ve kterých byly prováděny experimenty, a postulovali, že při dostatečně vysoké multiplicitě infekce může virus dopravit svůj genom do jádra buňky alternativní cestou (Camaur *et al.*, 1997; Trono & Gallay, 1997). Později se skutečně začaly objevovat informace o tom, že oproti původním předpokladům, není matrixový protein pro jadernou translokaci preintegračního komplexu nezbytný, a že na jaderném importu se může kromě dříve popsaných MA a proteinu Vpr podílet i integráza (Gallay *et al.*, 1997; Jayappa *et al.*, 2011; Reil *et al.*, 1998). Zdá se tedy, že jaderný import preiniciačního komplexu může být zajištěn několika způsoby, přičemž MA se na něm může podílet, pokud je fosforylován tyrosin na C konci proteinu.

8.3 Fosforylace kontroluje jaderný import preintegračního komplexu viru SIV

Virus SIV (simian immunodeficiency virus) je virus příbuzný viru HIV, který infikuje opice. Po vstupu SIV do buňky je jeho virová RNA převedena na dsDNA. Tato DNA je navázána na proteiny a tvoří preintegrační komplex, který je transportován do jádra hostitelské buňky. Translokaci preintegračního komplexu zprostředkovává virový protein Vpx (Fletcher *et al.*, 1996). Vpx je součástí virových částic (Kumar *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 1994) a je důležitý pro úspěšnou replikaci viru (Fletcher *et al.*, 1996).

Vpx může být transportován mezi cytoplazmou a jádrem a jeho jaderný import je zajištěn přítomností dvou jaderných lokalizačních signálů, které se sice neliší od klasického NLS, ale přesto mohou vázat importiny (Singhal *et al.*, 2006a). Bylo ovšem pozorováno, že aminokyselinová substituce potenciálních fosforylačních míst Vpx vede k cytoplazmatické lokalizaci proteinu. Tyto výsledky naznačily, že jaderný import Vpx by mohl být regulován fosforylací (Kumar *et al.*, 2003).

Autoři ze stejné skupiny později zjistili, že buněčná MAP kináza ERK2 je obsažena ve virových kapsidách a fosforyluje Vpx, a proto si položili otázku, zda fosforylace Vpx zprostředkovaná kinázou ERK2 může kontrolovat transport Vpx do jádra. Pomocí pokusů s různými inhibitory kináz skutečně zjistili, že zablokování fosforylace Vpx kinázou ERK2 vede k zablokování jaderného importu a virové replikace (Kumar *et al.*, 2005).

Práce Kumara a kolektivu (2005) společně s prací zabývající se vlivem fosforylace Vpx na jeho jaderný export (Singhal *et al.*, 2006b), ukázala, že regulace jaderné lokalizace Vpx pomocí fosforylace je zásadní pro to, aby Vpx mohl plnit různé funkce v průběhu buněčného cyklu – zajišťovat jaderný import preintegračního komplexu v časně fázi infekce a podílet se na skládání virových částic ve fázi pozdní.

8.4 Fosforylace inhibuje jaderný import proteinu v-Jun viru AVS 17

Virus AVS 17 (avian sarcoma virus 17) je virus způsobující sarkomy u kuřat. Součástí genomu AVS 17 je onkogen, kódující protein v-Jun, odvozený od buněčného genu pro protein c-Jun (Maki *et al.*, 1987). Exprese v-Jun může vést k transformaci buněk (Bos *et al.*, 1990).

V-Jun je v buňce transportován do jádra díky NLS, který se nachází mezi aminokyselinami 249 – 253. Na rozdíl od c-Jun, závisí jaderný import v-Jun na fázi buněčného cyklu a svého maxima dosahuje během fází S – G2. Tento rozdíl mezi c-Jun a v-Jun je způsoben substitucí aminokyseliny na pozici 248. Zatímco v proteinu c-Jun se zde nachází cystein, ve v-Jun je to serin (Chida & Vogt, 1992). Proto se autoři rozhodli zjistit, zda může být jaderný import v-Jun regulován fosforylací tohoto serinu a zaměřili se na tuto možnost ve své další práci. Ukázali, že serin 248 může být fosforylován a díky experimentům se synchronizovanými buňkami zjistili, že tato fosforylace závisí na buněčném cyklu. Maxima dosáhla ve fázi G1 a naopak minima ve fázi G2. Míra fosforylace serinu 248 tak korelovala s množstvím v-Jun v cytoplazmě. Sledování buněčné lokalizace peptidů obsahujících NLS v-Jun pak potvrdilo, že fosforylace serinu 248 inhibuje jaderný import v-Jun (Tagawa *et al.*, 1995).

V roce 2006 tyto závěry podpořila práce další skupiny. Její autoři syntetizovali různě modifikované peptidy obsahující NLS v-Jun, ke kterým byl připojen biotin, který byl posléze konjugován s fluorescenčně značeným avidinem. Tyto komplexy byly mikroinjekcí dopraveny do buněk a pomocí fluorescenční mikroskopie byla sledována jejich lokalizace. Opět bylo pozorováno, že fosforylace serinu 248 inhibuje jaderný import proteinu (Schlummer *et al.*, 2006).

Tagawa a kolektiv (1995) se domnívají, že regulace jaderného importu v-Jun pomocí fosforylace může souviset s jeho schopností transformace buněk. Jednalo by se ale o pouze jeden z několika faktorů určujících rozdílné vlastnosti c-Jun a v-Jun.

9. Závěr

Replikace celé řady virů probíhá v jádře hostitelské buňky, a proto musely tyto viry najít způsob, jak zajistit jaderný import svého genomu i proteinů. Většina z nich se naučila využívat (na místě je snad i termín zneužívat) buněčné transportní systémy. Často je důležité, aby byl transport proteinu do jádra přesně načasován. Tak je zajištěn ideální průběh replikace viru, případně je umožněno, aby protein během životního cyklu viru plnil různé funkce v závislosti na své lokalizaci. Tato práce se zabývala tím, jak může být jaderný import virových proteinů kontrolován jejich fosforylací.

Fosforylace může jaderný import virových proteinů a komplexů regulovat několika různými mechanismy. Hned u několika virů bylo popsáno, že fosforylace aminokyseliny nacházející se v blízkosti jaderného lokalizačního signálu, či přímo v NLS, může ovlivnit afinitu virového proteinu k importinům. To platí například pro virus SV40 nebo virus Epstein-Barrové. Kromě importinů ovšem fosforylace může regulovat i vazbu k dalším buněčným proteinům. Například u viru SV40 byla popsána inhibice jaderného importu T-ag po navázání proteinu na cytoplazmatický protein BRAP2.

Fosforylace může vést také ke změně konformace proteinu. Takto je vystaven jaderný lokalizační signál kapsidového proteinu viru hepatitidy B a pravděpodobně také sekvence umožňující translokaci proteinu Rex-2 viru HTLV-2.

V některých případech fosforylace nemusí ovlivnit jaderný import přímo, ale změna fosforylačního stavu může prakticky znehodnotit jeho efekt změnou rovnováhy mezi jaderným lokalizačním a exportním signálem. Protein je pak po importu do jádra okamžitě exportován zpět do cytoplazmy. V této práci je tato možnost regulace zmíněna u papilomavirů a viru vztekliny. V literatuře lze těchto případů najít více, ale v této práci nebyly rozebírány, protože práce se soustředí primárně na jaderný import nikoliv export.

V některých pracích zabývajících se vlivem fosforylace na jaderný import virových proteinů lze najít zmínku, že studium této regulace může v budoucnosti vést k objevu nových léků. Tato myšlenka nemusí být nijak nereálná. Již dnes byla vyvinuta řada léčiv, které inhibují činnost různých kináz (Bukanov *et al.*, 2006; Byrd *et al.*, 2013; Fleischmann *et al.*, 2012). Co nejpřesnější porozumění pohybu viru v buňce může přispět také k efektivnějšímu dopravování léčiv do buněk, ke kterému lze využít virům podobné částice odvozené od kapsidových proteinů.

Seznam použité literatury

- Alvisi, G., Jans, D. A., Guo, J., Pinna, L. A. & Ripalti, A. (2005). A protein kinase CK2 site flanking the nuclear targeting signal enhances nuclear transport of human cytomegalovirus ppUL44. *Traffic* **6**, 1002–1013.
- Alvisi, G., Roth, D. M., Camozzi, D., Pari, G. S., Loregian, A., Ripalti, A. & Jans, D. A. (2009). The flexible loop of the human cytomegalovirus DNA polymerase processivity factor ppUL44 is required for efficient DNA binding and replication in cells. *J Virol* **83**, 9567–9576.
- Alvisi, G., Marin, O., Pari, G., Mancini, M., Avanzi, S., Loregian, A., Jans, D. A. & Ripalti, A. (2011). Multiple phosphorylation sites at the C-terminus regulate nuclear import of HCMV DNA polymerase processivity factor ppUL44. *Virology* **417**, 259–267.
- Ambinder, R. F., Mullen, M. a, Chang, Y. N., Hayward, G. S. & Hayward, S. D. (1991). Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *J Virol* **65**, 1466–1478.
- Appleton, B. A., Brooks, J., Loregian, A., Filman, D. J., Coen, D. M. & Hogle, J. M. (2006). Crystal structure of the cytomegalovirus DNA polymerase subunit UL44 in complex with the C terminus from the catalytic subunit: Differences in structure and function relative to unliganded UL44. *J Biol Chem* **281**, 5224–5232.
- Arrese, M. & Portela, A. (1996). Serine 3 is critical for phosphorylation at the N-terminal end of the nucleoprotein of influenza virus A/Victoria/3/75. *J Virol* **70**, 3385–3391.
- Bian, X.-L., Rosas-Acosta, G., Wu, Y.-C. & Wilson, V. G. (2007). Nuclear import of bovine papillomavirus type 1 E1 protein is mediated by multiple alpha importins and is negatively regulated by phosphorylation near a nuclear localization signal. *J Virol* **81**, 2899–2908.
- Blondel, D., Regad, T., Poisson, N., Pavie, B., Harper, F., Pandolfi, P. P., De Thé, H. & Chelbi-Alix, M. K. (2002). Rabies virus P and small P products interact directly with PML and reorganize PML nuclear bodies. *Oncogene* **21**, 7957–7970.
- Boeckh, M. & Geballe, A. P. (2011). Cytomegalovirus: Pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest* **121**, 1673–1680.
- Bos, T. J., Monteclaro, F. S., Mitsunobu, F., Ball, A. R., Chang, C. H. W., Nishimura, T. & Vogt, P. K. (1990). Efficient transformation of chicken embryo fibroblasts by c-Jun requires structural modification in coding and noncoding sequences. *Genes Dev* **4**, 1677–1687.
- Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R. W. H. & Baudin, F. (2007). Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res* **124**, 12–21.
- Bresnahan, W. A. & Shenk, T. E. (2000). UL82 virion protein activates expression of immediate early viral genes in human cytomegalovirus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14506–14511.
- Bui, M., Wills, E. G., Helenius, a & Whittaker, G. R. (2000). Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J Virol* **74**, 1781–1786.
- Bui, M., Myers, J. E. & Whittaker, G. R. (2002). Nucleo-cytoplasmic localization of influenza virus nucleoprotein depends on cell density and phosphorylation. *Virus Res* **84**, 37–44.
- Bukanov, N. O., Smith, L. A., Klinger, K. W., Ledbetter, S. R. & Ibraghimov-Beskrovnaya, O. (2006). Long-lasting arrest of murine polycystic kidney disease with CDK inhibitor roscovitine. *Nature* **444**, 949–952.
- Bukrinskaya, A. G., Ghorpade, A., Heinzinger, N. K., Smithgall, T. E., Lewis, R. E. & Stevenson, M. (1996). Phosphorylation-dependent human immunodeficiency virus type 1 infection and nuclear targeting of viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 367–371.

- Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. & Stevenson, M. (1993).** A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**, 666–669.
- Bullido, R., Gómez-Puertas, P., Albo, C. & Portela, A. (2000).** Several protein regions contribute to determine the nuclear and cytoplasmic localization of the influenza A virus nucleoprotein. *J Gen Virol* **81**, 135–142.
- Butel, J. S. & Lednicky, J. A. (1999).** Cell and molecular biology of simian virus 40: Implications for human infections and disease. *J Natl Cancer Inst* **91**, 119–134.
- Byrd, J. C., Furman, R. R., Coutre, S. E., Flinn, I. W., Burger, J. A., Blum, K. A., Grant, B., Sharman, J. P., Coleman, M., Wierda, W., Jones, J. A., Zhao, W., Heerema, N. A., Johson, A. J., Sukbuntherng, J., Chang, B. Y., Clow, F., Hendrick, E., Buggy, J. J., James, D. F. & O'Brien, S. (2013).** Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **369**, 32–42.
- Camaur, D., Gallay, P., Swingler, S. & Trono, D. (1997).** Human immunodeficiency virus matrix tyrosine phosphorylation: characterization of the kinase and its substrate requirements. *J Virol* **71**, 6834–6841.
- Cao, J. Y., Shire, K., Landry, C., Gish, G. D., Pawson, T. & Frappier, L. (2014a).** Identification of a novel protein interaction motif in the regulatory subunit of casein kinase 2. *Mol Cell Biol* **34**, 246–58.
- Cao, S., Jiang, J., Li, J., Li, Y., Yang, L., Wang, S., Yan, J., Gao, G. F. & Liu, W. (2014b).** Characterization of the nucleocytoplasmic shuttle of the matrix protein of influenza B virus. *J Virol* **88**, 7464–7473.
- Cohen, J. I. (2000).** Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* **343**, 481–492.
- Cros, J. F., García-Sastre, A. & Palese, P. (2005).** An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* **6**, 205–213.
- Cueille, N., Nougarede, R., Mechali, F., Philippe, M. & Bonne-Andrea, C. (1998).** Functional interaction between the bovine papillomavirus virus type 1 replicative helicase E1 and cyclin E-Cdk2. *J Virol* **72**, 7255–7262.
- Cui, X., Ludgate, L., Ning, X. & Hu, J. (2013).** Maturation-associated destabilization of hepatitis B virus nucleocapsid. *J Virol* **87**, 11494–503.
- Daub, H., Blencke, S., Habenberger, P., Kurtenbach, A., Dennenmoser, J., Wissing, J., Ullrich, A. & Cotten, M. (2002).** Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol* **76**, 8124–8137.
- Deng, W., Lin, B. Y., Jin, G., Wheeler, C. G., Ma, T., Harper, J. W., Brooker, T. R. & Chow, L. T. (2004).** Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol* **78**, 13954–13965.
- Dhasan, M. S., Wang, J. C. Y., Hagan, M. F. & Zlotnick, A. (2012).** Differential assembly of Hepatitis B Virus core protein on single- and double-stranded nucleic acid suggest the dsDNA-filled core is spring-loaded. *Virology* **430**, 20–29.
- Dorfman, T., Mammano, F., Haseltine, W. A. & Göttlinger, H. G. (1994).** Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol* **68**, 1689–1696.
- Duclos-Vallée, J. C., Capel, F., Mabit, H. & Petit, M. A. (1998).** Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity. *J Gen Virol* **79**, 1665–1670.

- Duellman, S. J., Thompson, K. L., Coon, J. J. & Burgess, R. R. (2009).** Phosphorylation sites of Epstein-Barr virus EBNA1 regulate its function. *J Gen Virol* **90**, 2251–2259.
- Eckhardt, S. G., Milich, D. R. & McLachlan, A. (1991).** Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus. *J Virol* **65**, 575–582.
- Eckner, R., Ludlow, J. W., Lill, N. L., Oldread, E., Arany, Z., Modjtahedi, N., DeCaprio, J. A., Livingston, D. M. & Morgan, J. A. (1996).** Association of p300 and CBP with simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol* **16**, 3454–3464.
- Eisfeld, A. J., Turse, S. E., Jackson, S. A., Lerner, E. C. & Kinchington, P. R. (2006).** Phosphorylation of the varicella-zoster virus (VZV) major transcriptional regulatory protein IE62 by the VZV open reading frame 66 protein kinase. *J Virol* **80**, 1710–1723.
- Enomoto, M., Sawano, Y., Kosuge, S., Yamano, Y., Kuroki, K. & Ohtsuki, K. (2006).** High phosphorylation of HBV core protein by two α -type CK2-activated cAMP-dependent protein kinases in vitro. *FEBS Lett* **580**, 894–899.
- Ertl, P. F. & Powell, K. L. (1992).** Physical and functional interaction of human cytomegalovirus DNA polymerase and its accessory protein (ICP36) expressed in insect cells. *J Virol* **66**, 4126–4133.
- Fleischmann, R., Kremer, J., Cush, J., Schulze-Koops, H., Connell, C. A., Bradley, J. D., Gruben, D., Wallenstein, G. V., Zwillich, S. H. & Kanik, K. S. (2012).** Placebo-controlled trial of tofacitinib monotherapy in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **367**, 495–507.
- Fletcher, T. M., Brichacek, B., Sharova, N., Newman, M. A., Stivahtis, G., Sharp, P. M., Emerman, M., Hahn, B. H. & Stevenson, M. (1996).** Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV(SM). *EMBO J* **15**, 6155–6165.
- Fontes, M. R. M., Teh, T., Toth, G., John, A., Pavo, I., Jans, D. A. & Kobe, B. (2003).** Role of flanking sequences and phosphorylation in the recognition of the simian-virus-40 large T-antigen nuclear localization sequences by importin- α . *Biochem J* **375**, 339–349.
- Frappier, L. & O'Donnell, M. (1991).** Overproduction, purification, and characterization of EBNA1, the origin binding protein of Epstein-Barr virus. *J Biol Chem* **266**, 7819–7826.
- Freed, E. O., Englund, G., Maldarelli, F. & Martin, M. A. (1997).** Phosphorylation of residue 131 of HIV-1 matrix is not required for macrophage infection. *Cell* **88**, 171–174.
- Fulcher, A. J., Roth, D. M., Fatima, S., Alvisi, G. & Jans, D. A. (2010a).** The BRCA-1 binding protein BRAP2 is a novel, negative regulator of nuclear import of viral proteins, dependent on phosphorylation flanking the nuclear localization signal. *FASEB J* **24**, 1454–1466.
- Fulcher, A. J., Dias, M. M. & Jans, D. A. (2010b).** Binding of p110 retinoblastoma protein inhibits nuclear import of simian virus SV40 large tumor antigen. *J Biol Chem* **285**, 17744–17753.
- Gallay, P., Swingler, S., Aiken, C. & Trono, D. (1995a).** HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* **80**, 379–388.
- Gallay, P., Swingler, S., Song, J., Bushman, F. & Trono, D. (1995b).** HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* **83**, 569–576.
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D. & Trono, D. (1997).** HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9825–9830.
- Ganem, D. & Prince, A. M. (2004).** Hepatitis B virus infection - natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* **350**, 1118–1129.

- Gazina, E. V., Fielding, J. E., Lin, B. & Anderson, D. A. (2000).** Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses. *J Virol* **74**, 4721–4728.
- Gershon, A. A., Sherman, D. L., Zhu, Z., Gabel, C. A., Ambron, R. T. & Gershon, M. D. (1994).** Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: Final envelopment in the trans-Golgi network. *J Virol* **68**, 6372–6390.
- Gershon, A. A. & Gershon, M. D. (2013).** Pathogenesis and current approaches to control of varicella-zoster virus infections. *Clin Microbiol Rev* **26**, 728–743.
- Green, P. L., Xie, Y. M. & Chen, I. S. (1991).** The Rex proteins of human T-cell leukemia virus type II differ by serine phosphorylation. *J Virol* **65**, 546–550.
- Green, P. L., Yip, M. T., Xie, Y. & Chen, I. S. (1992).** Phosphorylation regulates RNA binding by the human T-cell leukemia virus Rex protein. *J Virol* **66**, 4325–4330.
- Gregoriades, A., Christie, T. & Markarian, K. (1984).** The membrane (M1) protein of influenza virus occurs in two forms and is a phosphoprotein. *J Virol* **49**, 229–235.
- Guo, H., Mao, R., Block, T. M. & Guo, J.-T. (2010).** Production and function of the cytoplasmic deproteinized relaxed circular DNA of hepadnaviruses. *J Virol* **84**, 387–396.
- Gupta, A. K., Blondel, D., Choudhary, S. & Banerjee, A. K. (2000).** The phosphoprotein of rabies virus is phosphorylated by a unique cellular protein kinase and specific isomers of protein kinase C. *J Virol* **74**, 91–98.
- Haffar, O. K., Popov, S., Dubrovsky, L., Agostini, I., Tang, H., Pushkarsky, T., Nadler, S. G. & Bukrinsky, M. (2000).** Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *J Mol Biol* **299**, 359–368.
- Hatton, T., Zhou, S. & Standring, D. N. (1992).** RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J Virol* **66**, 5232–5241.
- Hensel, G. M., Meyer, H. H., Buchmann, I., Pommerehne, D., Schmolke, S., Plachter, B., Radsak, K. & Kern, H. F. (1996).** Intracellular localization and expression of the human cytomegalovirus matrix phosphoprotein pp71 (ppUL82): Evidence for its translocation into the nucleus. *J Gen Virol* **77**, 3087–3097.
- Hilmer, J. K., Zlotnick, A. & Bothner, B. (2008).** Conformational equilibria and rates of localized motion within hepatitis B virus capsids. *J Mol Biol* **375**, 581–594.
- Hjelle, B., Appenzeller, O., Mills, R., Alexander, S., Torrez-Martinez, N., Jahnke, R. & Ross, G. (1992).** Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. *Lancet* **339**, 645–646.
- Hsu, C.-Y., Mechali, F. & Bonne-Andrea, C. (2007).** Nucleocytoplasmic shuttling of bovine papillomavirus E1 helicase downregulates viral DNA replication in S phase. *J Virol* **81**, 384–394.
- Hübner, S., Xiao, C. Y. & Jans, D. A. (1997).** The protein kinase CK2 site (Ser 111/112) enhances recognition of the simian virus 40 large T-antigen nuclear localization sequence by importin. *J Biol Chem* **272**, 17191–17195.
- Hughes, F. J. & Romanos, M. A. (1993).** E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res* **21**, 5817–5823.
- Hung, S. C., Kang, M. S. & Kieff, E. (2001).** Maintenance of Epstein-Barr virus (EBV) oriP-based episomes requires EBV-encoded nuclear antigen-1 chromosome-binding domains, which can be replaced by high-mobility group-I or histone H1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1865–1870.

- Hutchinson, E. C., Denham, E. M., Thomas, B., Trudgian, D. C., Hester, S. S., Ridlova, G., York, A., Turrell, L. & Fodor, E. (2012).** Mapping the phosphoproteome of influenza A and B viruses by mass spectrometry. *PLoS Pathog* **8**.
- Chau, N. H., Vanson, C. D. & Kerry, J. A. (1999).** Transcriptional regulation of the human cytomegalovirus US11 early gene. *J Virol* **73**, 863–870.
- Chen, C., Wang, J. C. Y. & Zlotnick, A. (2011).** A kinase chaperones hepatitis B virus capsid assembly and captures capsid dynamics in vitro. *PLoS Pathog* **7**.
- Chenik, M., Chebli, K. & Blondel, D. (1995).** Translation initiation at alternate in-frame AUG codons in the rabies virus phosphoprotein mRNA is mediated by a ribosomal leaky scanning mechanism. *J Virol* **69**, 707–712.
- Chida, K. & Vogt, P. K. (1992).** Nuclear translocation of viral Jun but not of cellular Jun is cell cycle dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4290–4294.
- Chu, T.-H., Liou, A.-T., Su, P.-Y., Wu, H.-N. & Shih, C. (2013).** Nucleic acid chaperone activity associated with the ARD domain of human hepatitis B virus core protein. *J Virol* **88**, 2530–2543.
- Ito, S., Ikeda, M., Kato, N., Matsumoto, A., Ishikawa, Y., Kumakubo, S. & Yanagi, K. (2000).** Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 binds to nuclear transporter karyopherin alpha1/NPI-1 in addition to karyopherin alpha2/Rch1. *Virology* **266**, 110–119.
- Jans, D. A., Ackermann, M. J., Bischoff, J. R., Beach, D. H. & Peters, R. (1991).** p34cdc2-mediated phosphorylation at T124 inhibits nuclear import of SV-40 T antigen proteins. *J Cell Biol* **115**, 1203–1212.
- Jayappa, K. D., Ao, Z., Yang, M., Wang, J. & Yao, X. (2011).** Identification of critical motifs within HIV-1 integrase required for importin $\alpha 3$ interaction and viral cDNA nuclear import. *J Mol Biol* **410**, 847–862.
- Jung, J., Hwang, S. G., Chwae, Y.-J., Park, S., Shin, H.-J. & Kim, K. (2014).** Phosphoacceptors threonine 162 and serines 170 and 178 within the carboxyl-terminal RRRS/T motif of the hepatitis B virus core protein make multiple contributions to hepatitis B virus replication. *J Virol* **88**, 8754–67.
- Kalejta, R. F. & Shenk, T. (2003a).** Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of the Rb family of tumor suppressors by the human cytomegalovirus pp71 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3263–3268.
- Kalejta, R. F. & Shenk, T. (2003b).** The human cytomegalovirus UL82 gene product (pp71) accelerates progression through the G1 phase of the cell cycle. *J Virol* **77**, 3451–3459.
- Kalejta, R. F., Bechtel, J. T. & Shenk, T. (2003).** Human cytomegalovirus pp71 stimulates cell cycle progression by inducing the proteasome-dependent degradation of the retinoblastoma family of tumor suppressors. *Mol Cell Biol* **23**, 1885–1895.
- Kang, M.-S., Lee, E. K., Soni, V., Lewis, T. A., Koehler, A. N., Srinivasan, V. & Kieff, E. (2011).** Roscovitine inhibits EBNA1 serine 393 phosphorylation, nuclear localization, transcription, and episome maintenance. *J Virol* **85**, 2859–2868.
- Kann, M. & Gerlich, W. H. (1994).** Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J Virol* **68**, 7993–8000.
- Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W. H. & Helenius, A. (1999).** Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **145**, 45–55.
- Kau, J. H. & Ting, L. P. (1998).** Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J Virol* **72**, 3796–3803.

- Kennedy, G., Komano, J. & Sugden, B. (2003).** Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14269–14274.
- Kenyon, T. K., Lynch, J., Hay, J., Ruyechan, W. & Grose, C. (2001).** Varicella-zoster virus ORF47 protein serine kinase: Characterization of a cloned, biologically active phosphotransferase and two viral substrates, ORF62 and ORF63. *J Virol* **75**, 8854–8858.
- Kesic, M., Ward, M., Semmes, O. J. & Green, P. L. (2009).** Site-specific phosphorylation regulates human T-cell leukemia virus type 2 Rex function in vivo. *J Virol* **83**, 8859–8868.
- Ketha, K. M. V & Atreya, C. D. (2008).** Application of bioinformatics-coupled experimental analysis reveals a new transport-competent nuclear localization signal in the nucleoprotein of influenza A virus strain. *BMC Cell Biol* **9**.
- Kinchington, P. R., Houghland, J. K., Arvin, A. M., Ruyechan, W. T. & Hay, J. (1992).** The varicella-zoster virus immediate-early protein IE62 is a major component of virus particles. *J Virol* **66**, 359–366.
- Kinchington, P. R. & Turse, S. E. (1998).** Regulated nuclear localization of the varicella-zoster virus major regulatory protein, IE62. *J Infect Dis* **178 Suppl**, S16–S21.
- Kinchington, P. R., Fite, K. & Turse, S. E. (2000).** Nuclear accumulation of IE62, the varicella-zoster virus (VZV) major transcriptional regulatory protein, is inhibited by phosphorylation mediated by the VZV open reading frame 66 protein kinase. *J Virol* **74**, 2265–2277.
- Kinchington, P. R., Fite, K., Seman, A. & Turse, S. E. (2001).** Virion association of IE62, the varicella-zoster virus (VZV) major transcriptional regulatory protein, requires expression of the VZV open reading frame 66 protein kinase. *J Virol* **75**, 9106–9113.
- Kistner, O., Muller, K. & Scholtissek, C. (1989).** Differential phosphorylation of the nucleoprotein of influenza A viruses. *J Gen Virol* **70**, 2421–2431.
- Kitamura, R., Sekimoto, T., Ito, S., Harada, S., Yamagata, H., Masai, H., Yoneda, Y. & Yanagi, K. (2006).** Nuclear import of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 mediated by NPI-1 (Importin alpha5) is up- and down-regulated by phosphorylation of the nuclear localization signal for which Lys379 and Arg380 are essential. *J Virol* **80**, 1979–1991.
- Knipe, D. M. & Howley, P. M. (2007).** *Fields virology*, Chapters: Herpesviridae, Papillomaviridae, Retroviridae, 5th edn. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins.
- Krosky, P. M., Baek, M., Jahng, W. J., Barrera, I., Harvey, R. J., Biron, K. K., Coen, D. M. & Sethna, P. B. (2003).** The human cytomegalovirus UL44 protein is a substrate for the UL97 protein kinase. *J Virol* **77**, 7720–7727.
- Kumar, P. R., Singhal, P. K., Vinod, S. S. & Mahalingam, S. (2003).** A non-canonical transferable signal mediates nuclear import of simian immunodeficiency virus Vpx protein. *J Mol Biol* **331**, 1141–1156.
- Kumar, P. R., Singhal, P. K., Subba Rao, M. R. K. & Mahalingam, S. (2005).** Phosphorylation by MAPK regulates simian immunodeficiency virus Vpx protein nuclear import and virus infectivity. *J Biol Chem* **280**, 8553–8563.
- Kusuhara, K., Anderson, M., Pettiford, S. M. & Green, P. L. (1999).** Human T-cell leukemia virus type 2 Rex protein increases stability and promotes nuclear to cytoplasmic transport of gag/pol and env RNAs. *J Virol* **73**, 8112–8119.
- Lan, Y. T., Li, J., Liao, W. & Ou, J. (1999).** Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication. *Virology* **259**, 342–348.
- Lebrun, M., Thelen, N., Thiry, M., Riva, L., Ote, I., Condé, C., Vandevenne, P., Di Valentin, E., Bontems, S. & Sadzot-Delvaux, C. (2014).** Varicella-zoster virus induces the formation of dynamic nuclear capsid aggregates. *Virology* **454-455**, 311–327.

- Leisenfelder, S. A., Kinchington, P. R. & Moffat, J. F. (2008).** Cyclin-dependent kinase 1/cyclin B1 phosphorylates varicella-zoster virus IE62 and is incorporated into virions. *J Virol* **82**, 12116–12125.
- Leng, X. & Wilson, V. G. (1994).** Genetically defined nuclear localization signal sequence of bovine papillomavirus E1 protein is necessary and sufficient for the nuclear localization of E1-beta-galactosidase fusion proteins. *J Gen Virol* **75**, 2463–2467.
- Lentz, M. R., Pak, D., Mohr, I. & Botchan, M. R. (1993).** The E1 replication protein of bovine papillomavirus type 1 contains an extended nuclear localization signal that includes a p34cdc2 phosphorylation site. *J Virol* **67**, 1414–1423.
- Lentz, M., Zanardi, T., Filzen, R., Carter, J. & Hella, M. (2002).** Functional analysis of a carboxyl-terminal phosphorylation mutant of the bovine papillomavirus E1 protein. *J Mol Biol* **316**, 599–609.
- Lewellyn, E. B. & Loeb, D. D. (2011).** Serine phosphoacceptor sites within the core protein of hepatitis B virus contribute to genome replication pleiotropically. *PLoS One* **6**.
- Li, H.-C., Huang, E.-Y., Su, P.-Y., Wu, S.-Y., Yang, C.-C., Lin, Y.-S., Chang, W.-C. & Shih, C. (2010).** Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles. *PLoS Pathog* **6**.
- Liao, W. & Ou, J. H. (1995).** Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs. *J Virol* **69**, 1025–1029.
- Liu, B. & Stinski, M. F. (1992).** Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. *J Virol* **66**, 4434–4444.
- Loregian, A., Appleton, B. A., Hogle, J. M. & Coen, D. M. (2004).** Specific residues in the connector loop of the human cytomegalovirus DNA polymerase accessory protein UL44 are crucial for interaction with the UL54 catalytic subunit. *J Virol* **78**, 9084–9092.
- Ludgate, L., Ning, X., Nguyen, D. H., Adams, C., Mentzer, L. & Hu, J. (2012).** Cyclin-dependent kinase 2 phosphorylates S/T-P sites in the hepadnavirus core protein C-terminal domain and is incorporated into viral capsids. *J Virol* **86**, 12237–12250.
- Ma, T., Zou, N., Lin, B. Y., Chow, L. T. & Harper, J. W. (1999).** Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 382–387.
- Maki, Y., Bos, T. J., Davis, C., Starbuck, M. & Vogt, P. K. (1987).** Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2848–2852.
- Malcles, M.-H., Cueille, N., Mechali, F., Coux, O. & Bonne-Andrea, C. (2002).** Regulation of bovine papillomavirus replicative helicase E1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Virol* **76**, 11350–11358.
- Marschall, M., Freitag, M., Suchy, P., Romaker, D., Kupfer, R., Hanke, M. & Stamminger, T. (2003).** The protein kinase pUL97 of human cytomegalovirus interacts with and phosphorylates the DNA polymerase processivity factor pUL44. *Virology* **311**, 60–71.
- Mavrakis, M., McCarthy, A. A., Roche, S., Blondel, D. & Ruigrok, R. W. H. (2004).** Structure and function of the C-terminal domain of the polymerase cofactor of rabies virus. *J Mol Biol* **343**, 819–831.
- May, E., Omilli, F., Borde, J. & Scieller, P. (1992).** Simian virus 40 T antigen activates the late promoter by modulating the activity of negative regulatory elements. *J Virol* **66**, 3347–3354.

- McLachlan, A., Milich, D. R., Raney, A. K., Riggs, M. G., Hughes, J. L., Sorge, J. & Chisari, F. V. (1987).** Expression of hepatitis B virus surface and core antigens: Influences of pre-S and precore sequences. *J Virol* **61**, 683–692.
- McShan, G. D. & Wilson, V. G. (2000).** Contribution of bovine papillomavirus type 1 E1 protein residue 48 to replication function. *J Gen Virol* **81**, 1995–2004.
- McShan, G. D. & Wilson, V. G. (1997).** Casein kinase II phosphorylates bovine papillomavirus type 1 E1 in vitro at a conserved motif. *J Gen Virol* **78**, 171–177.
- Meng, D., Hjelm, R. P., Hu, J. & Wu, J. (2011).** A theoretical model for the dynamic structure of hepatitis B nucleocapsid. *Biophys J* **101**, 2476–2484.
- Mosammaparast, N. & Pemberton, L. F. (2004).** Karyopherins: From nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol* **14**, 547–556.
- Moseley, G. W., Filmer, R. P., DeJesus, M. A. & Jans, D. A. (2007).** Nucleocytoplasmic distribution of rabies virus P-protein is regulated by phosphorylation adjacent to C-terminal nuclear import and export signals. *Biochemistry* **46**, 12053–12061.
- Narayan, M., Kusuhara, K. & Green, P. L. (2001).** Phosphorylation of two serine residues regulates human T-cell leukemia virus type 2 Rex function. *J Virol* **75**, 8440–8448.
- Narayan, M., Younis, I., D'Agostino, D. M. & Green, P. L. (2003).** Functional domain structure of human T-cell leukemia virus type 2 rex. *J Virol* **77**, 12829–12840.
- Nardoizzi, J., Wenta, N., Yasuhara, N., Vinkemeier, U. & Cingolani, G. (2010a).** Molecular basis for the recognition of phosphorylated STAT1 by importin $\alpha 5$. *J Mol Biol* **402**, 83–100.
- Nardoizzi, J. D., Lott, K. & Cingolani, G. (2010b).** Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Commun Signal* **8**, 32–49.
- Neumann, G., Castrucci, M. R. & Kawaoka, Y. (1997).** Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol* **71**, 9690–9700.
- Newman, M., Chua, P. K., Tang, F.-M., Su, P.-Y. & Shih, C. (2009).** Testing an electrostatic interaction hypothesis of hepatitis B virus capsid stability by using an in vitro capsid disassembly/reassembly system. *J Virol* **83**, 10616–10626.
- Ng, T. I., Keenan, L., Kinchington, P. R. & Grose, C. (1994).** Phosphorylation of varicella-zoster virus open reading frame (ORF) 62 regulatory product by viral ORF 47-associated protein kinase. *J Virol* **68**, 1350–1359.
- O'Neill, R. E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P. & Moroianu, J. (1995).** Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem* **270**, 22701–22704.
- Ohta, M., Nyunoya, H., Tanaka, H., Okamoto, T., Akagi, T. & Shimotohno, K. (1988).** Identification of a cis-regulatory element involved in accumulation of human T-cell leukemia virus type II genomic mRNA. *J Virol* **62**, 4445–4451.
- Oksayan, S., Wiltzer, L., Rowe, C. L., Blondel, D., Jans, D. A. & Moseley, G. W. (2012).** A novel nuclear trafficking module regulates the nucleocytoplasmic localization of the rabies virus interferon antagonist, P protein. *J Biol Chem* **287**, 28112–28121.
- Ozawa, M., Fujii, K., Muramoto, Y., Yamada, S., Yamayoshi, S., Takada, A., Goto, H., Horimoto, T. & Kawaoka, Y. (2007).** Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J Virol* **81**, 30–41.
- Palamara, A. T., Nencioni, L., Aquilano, K., De Chiara, G., Hernandez, L., Cozzolino, F., Ciriolo, M. R. & Garaci, E. (2005).** Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. *J Infect Dis* **191**, 1719–1729.

- Panté, N. & Kann, M. (2002).** Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* **13**, 425–434.
- Pari, G. S., Kacica, M. A. & Anders, D. G. (1993).** Open reading frames UL44, IRS1/TRS1, and UL36-38 are required for transient complementation of human cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA synthesis. *J Virol* **67**, 2575–2582.
- Pasdeloup, D., Poisson, N., Raux, H., Gaudin, Y., Ruigrok, R. W. H. & Blondel, D. (2005).** Nucleocytoplasmic shuttling of the rabies virus P protein requires a nuclear localization signal and a CRM1-dependent nuclear export signal. *Virology* **334**, 284–293.
- Penkert, R. R. & Kalejta, R. F. (2010).** Nuclear localization of tegument-delivered pp71 in human cytomegalovirus-infected cells is facilitated by one or more factors present in terminally differentiated fibroblasts. *J Virol* **84**, 9853–9863.
- Perera, L. P., Mosca, J. D., Ruyechan, W. T. & Hay, J. (1992).** Regulation of varicella-zoster virus gene expression in human T lymphocytes. *J Virol* **66**, 5298–5304.
- Le Pogam, S., Chua, P. K., Newman, M. & Shih, C. (2005).** Exposure of RNA templates and encapsidation of spliced viral RNA are influenced by the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core antigen (HBcAg 165-173). *J Virol* **79**, 1871–1887.
- Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D. & Gallo, R. C. (1980).** Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7415–7419.
- Polvino-Bodnar, M., Kiso, J. & Schaffer, P. A. (1988).** Mutational analysis of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA 1). *Nucleic Acids Res* **16**, 3415–3435.
- Rabe, B., Vlachou, A., Panté, N., Helenius, A. & Kann, M. (2003).** Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9849–9854.
- Rabe, B., Delaleau, M., Bischof, A., Foss, M., Sominskaya, I., Pumpens, P., Cazenave, C., Castroviejo, M. & Kann, M. (2009).** Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids. *PLoS Pathog* **5**.
- Rangasamy, D. & Wilson, V. G. (2000).** Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein. *J Biol Chem* **275**, 30487–30495.
- Reed, S. I., Stark, G. R. & Alwine, J. C. (1976).** Autoregulation of simian virus 40 gene A by T antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 3083–3087.
- Reil, H., Bukovsky, A. A., Gelderblom, H. R. & Göttlinger, H. (1998).** Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. *EMBO J* **17**, 2699–2708.
- Reinhardt, J. & Wolff, T. (2000).** The influenza A virus M1 protein interacts with the cellular receptor of activated C kinase (RACK) 1 and can be phosphorylated by protein kinase C. *Vet Microbiol* **74**, 87–100.
- Reisman, D. & Sugden, B. (1986).** Trans activation of an Epstein-Barr viral transcriptional enhancer by the Epstein-Barr viral nuclear antigen 1. *Mol Cell Biol* **6**, 3838–3846.
- Resnick-Silverman, L., Pang, Z., Li, G., Jha, K. K. & Ozer, H. L. (1991).** Retinoblastoma protein and simian virus 40-dependent immortalization of human fibroblasts. *J Virol* **65**, 2845–2852.
- Rihs, H. P., Jans, D. A., Fan, H. & Peters, R. (1991).** The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *EMBO J* **10**, 633–639.
- Rihs, H. & Peters, R. (1989).** Nuclear transport kinetics depend on phosphorylation-site-containing sequences flanking the karyophilic signal of the Simian virus 40 T-antigen. *EMBO J* **8**, 1479–1484.

- Ripalti, A., Boccuni, M. C., Campanini, F. & Landini, M. P. (1995).** Cytomegalovirus-mediated induction of antisense mRNA expression to UL44 inhibits virus replication in an astrocytoma cell line: identification of an essential gene. *J Virol* **69**, 2047–2057.
- Roseman, A. M., Berriman, J. A., Wynne, S. A., Butler, P. J. G. & Crowther, R. A. (2005).** A structural model for maturation of the hepatitis B virus core. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15821–15826.
- Sedman, J. & Stenlund, A. (1998).** The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J Virol* **72**, 6893–6897.
- Seeger, C. & Mason, W. S. (2000).** Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 51–68.
- Seo, Y. S., Müller, F., Lusky, M. & Hurwitz, J. (1993).** Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 702–706.
- Shen, W., Westgard, E., Huang, L., Ward, M. D., Osborn, J. L., Chau, N. H., Collins, L., Marcum, B., Koach, M. A., Bibbs, J., Semmes, O. J. & Kerry, J. A. (2008).** Nuclear trafficking of the human cytomegalovirus pp71 (ppUL82) tegument protein. *Virology* **376**, 42–52.
- Shima, H., Takano, M., Shimotohno, K. & Miwa, M. (1986).** Identification of p26Xb and p24Xb of human T-cell leukemia virus type II. *FEBS Lett* **209**, 289–294.
- Shire, K., Kapoor, P., Jiang, K., Hing, M. N. T., Sivachandran, N., Nguyen, T. & Frappier, L. (2006).** Regulation of the EBNA1 Epstein-Barr virus protein by serine phosphorylation and arginine methylation. *J Virol* **80**, 5261–5272.
- Scheidtmann, K. H., Echle, B. & Walter, G. (1982).** Simian virus 40 large T antigen is phosphorylated at multiple sites clustered in two separate regions. *J Virol* **44**, 116–133.
- Scheidtmann, K. H., Hardung, M., Echle, B. & Walter, G. (1984).** DNA-binding activity of simian virus 40 large T antigen correlates with a distinct phosphorylation state. *J Virol* **50**, 1–12.
- Schlummer, S., Vetter, R., Kuder, N., Henkel, A., Chen, Y. X., Li, Y. M., Kuhlmann, J. & Waldmann, H. (2006).** Influence of serine O-glycosylation or O-phosphorylation close to the vJun nuclear localisation sequence on nuclear import. *ChemBioChem* **7**, 88–97.
- Schmitz, A., Schwarz, A., Foss, M., Zhou, L., Rabe, B., Hoellenriegel, J., Stoeber, M., Panté, N. & Kann, M. (2010).** Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. *PLoS Pathog* **6**.
- Schneider, J. & Fanning, E. (1988).** Mutations in the phosphorylation sites of simian virus 40 (SV40) T antigen alter its origin DNA-binding specificity for sites I or II and affect SV40 DNA replication activity. *J Virol* **62**, 1598–1605.
- Schuck, S., Ruse, C. & Stenlund, A. (2013).** CK2 phosphorylation inactivates DNA binding by the papillomavirus E1 and E2 proteins. *J Virol* **87**, 7668–7679.
- Silva, L. A., Strang, B. L., Lin, E. W., Kamil, J. P. & Coen, D. M. (2011).** Sites and roles of phosphorylation of the human cytomegalovirus DNA polymerase subunit UL44. *Virology* **417**, 268–280.
- Singhal, P. K., Kumar, P. R., Rao, M. R. K. S., Kyasani, M. & Mahalingam, S. (2006a).** Simian immunodeficiency virus Vpx is imported into the nucleus via importin alpha-dependent and -independent pathways. *J Virol* **80**, 526–536.
- Singhal, P. K., Rajendra Kumar, P., Subba Rao, M. R. K. & Mahalingam, S. (2006b).** Nuclear export of simian immunodeficiency virus Vpx protein. *J Virol* **80**, 12271–12282.
- Stahl, H., Dröge, P. & Knippers, R. (1986).** DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen. *EMBO J* **5**, 1939–1944.

- Stewart, M. (2007).** Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 195–208.
- Tagawa, T., Kuroki, T., Vogt, P. K. & Chida, K. (1995).** The cell cycle-dependent nuclear import of v-Jun is regulated by phosphorylation of a serine adjacent to the nuclear localization signal. *J Cell Biol* **130**, 255–263.
- Tegtmeier, P. (1972).** Simian virus 40 deoxyribonucleic acid synthesis: the viral replicon. *J Virol* **10**, 591–598.
- Trono, D. & Gallay, P. (1997).** In Response to Freed et al. *Cell* **88**, 173–174.
- Vancurova, I., Jochova-Rupes, J., Lou, W. & Paine, P. L. (1995).** Distinct phosphorylation sites differentially influence facilitated transport of an NLS-protein and its subsequent intranuclear binding. *Biochem Biophys Res Commun* **217**, 419–427.
- Vidy, A., Chelbi-Alix, M. & Blondel, D. (2005).** Rabies virus P protein interacts with STAT1 and inhibits interferon signal transduction pathways. *J Virol* **79**, 14411–14420.
- Vidy, A., El Bougrini, J., Chelbi-Alix, M. K. & Blondel, D. (2007).** The nucleocytoplasmic rabies virus P protein counteracts interferon signaling by inhibiting both nuclear accumulation and DNA binding of STAT1. *J Virol* **81**, 4255–4263.
- Waga, S., Bauer, G. & Stillman, B. (1994).** Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J Biol Chem* **269**, 10923–10934.
- Wang, C. T. & Barklis, E. (1993).** Assembly, processing, and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 gag mutants. *J Virol* **67**, 4264–4273.
- Wang, J. C. Y., Dhason, M. S. & Zlotnick, A. (2012).** Structural organization of pregenomic RNA and the carboxy-terminal domain of the capsid protein of hepatitis B virus. *PLoS Pathog* **8**, 25–27.
- Wang, P., Palese, P. & O'Neill, R. E. (1997).** The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol* **71**, 1850–1856.
- Wang, S., Zhao, Z., Bi, Y., Sun, L., Liu, X. & Liu, W. (2013).** Tyrosine 132 phosphorylation of influenza A virus M1 protein is crucial for virus replication by controlling the nuclear import of M1. *J Virol* **87**, 6182–91.
- Wang, Z. H., Gershon, M. D., Lungu, O., Zhu, Z., Mallory, S., Arvin, A. M. & Gershon, A. A. (2001).** Essential role played by the C-terminal domain of glycoprotein I in envelopment of varicella-zoster virus in the trans-Golgi network: Interactions of glycoproteins with tegument. *J Virol* **75**, 323–340.
- Weber, F., Kochs, G., Gruber, S. & Haller, O. (1998).** A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins. *Virology* **250**, 9–18.
- Weigand, K., Knaust, A. & Schaller, H. (2010).** Assembly and export determine the intracellular distribution of hepatitis B virus core protein subunits. *J Gen Virol* **91**, 59–67.
- Whittaker, G., Kemler, I. & Helenius, A. (1995).** Hyperphosphorylation of mutant influenza virus matrix protein, M1, causes its retention in the nucleus. *J Virol* **69**, 439–445.
- Whittaker, G., Bui, M. & Helenius, A. (1996).** Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *J Virol* **70**, 2743–2756.
- Wu, H., Kapoor, P. & Frappier, L. (2002).** Separation of the DNA replication, segregation, and transcriptional activation functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J Virol* **76**, 2480–2490.
- Wu, W. W. H., Sun, Y.-H. B. & Panté, N. (2007a).** Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein. *Virol J* **4**, 49–61.

- Wu, W. W. H., Weaver, L. L. & Panté, N. (2007b).** Ultrastructural analysis of the nuclear localization sequences on influenza A ribonucleoprotein complexes. *J Mol Biol* **374**, 910–916.
- Wu, W. W. & Panté, N. (2009).** The directionality of the nuclear transport of the influenza A genome is driven by selective exposure of nuclear localization sequences on nucleoprotein. *Virol J* **6**, 68–80.
- Wu, X., Conway, J. A., Kim, J. & Kappes, J. C. (1994).** Localization of the Vpx packaging signal within the C terminus of the human immunodeficiency virus type 2 Gag precursor protein. *J Virol* **68**, 6161–6169.
- Xiao, C. Y., Hübner, S. & Jans, D. A. (1997).** SV40 large tumor antigen nuclear import is regulated by the double-stranded DNA-dependent protein kinase site (Serine 120) flanking the nuclear localization sequence. *J Biol Chem* **272**, 22191–22198.
- Ye, Z., Robinson, D. & Wagner, R. R. (1995).** Nucleus-targeting domain of the matrix protein (M1) of influenza virus. *J Virol* **69**, 1964–1970.
- Ye, Z. P., Baylor, N. W. & Wagner, R. R. (1989).** Transcription-inhibition and RNA-binding domains of influenza A virus matrix protein mapped with anti-idiotypic antibodies and synthetic peptides. *J Virol* **63**, 3586–3594.
- Yeh, C. T., Liaw, Y. F. & Ou, J. H. (1990).** The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J Virol* **64**, 6141–6147.
- Yousaf, M., Qasim, M., Zia, S., Rehman Khan, M. U., Ashfaq, U. & Khan, S. (2012).** Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment. *Virol J* **9**, 50–55.
- Yu, J.-H., Lin, B. Y., Deng, W., Broker, T. R. & Chow, L. T. (2007).** Mitogen-activated protein kinases activate the nuclear localization sequence of human papillomavirus type 11 E1 DNA helicase to promote efficient nuclear import. *J Virol* **81**, 5066–5078.
- Yu, M., Liu, X., Cao, S., Zhao, Z., Zhang, K., Xie, Q., Chen, C., Gao, S., Bi, Y., Sun, L., Ye, X., Gao, G. F. & Liu, W. (2012).** Identification and characterization of three novel nuclear export signals in the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol* **86**, 4970–4980.
- Zanardi, T. A., Stanley, C. M., Saville, B. M., Spacek, S. M. & Lentz, M. R. (1997).** Modulation of bovine papillomavirus DNA replication by phosphorylation of the viral E1 protein. *Virology* **228**, 1–10.
- Zehender, G., Colasante, C., Santambrogio, S., De Maddalena, C., Massetto, B., Cavalli, B., Jacchetti, G., Fasan, M., Adorni, F., Osio, M., Moroni, M. & Galli, M. (2002).** Increased risk of developing peripheral neuropathy in patients coinfecting with HIV-1 and HTLV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr* **31**, 440–447.
- Zhu, J., Liao, G., Shan, L., Zhang, J., Chen, M.-R., Hayward, G. S., Hayward, S. D., Desai, P. & Zhu, H. (2009).** Protein array identification of substrates of the Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4. *J Virol* **83**, 5219–5231.
- Zlotnick, A., Cheng, N., Stahl, S. J., Conway, J. F., Steven, A. C. & Wingfield, P. T. (1997).** Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: Implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9556–9561.